

臺北醫學大學生藥研究所
Graduate Institute of Pharmacognosy Taipei
Medical University
碩士論文
Master Thesis

指導教授：李宗徽 博士
Adviser : Tzong-Huei Lee, Ph.D

台灣三種海洋細菌醱酵液
之生物活性成分研究

Studies on the bioactive constituents of the
fermented broth of three marine bacterial species
isolated in Taiwan

研究生：李翊弘
Graduate student : Yi-Hung Lee

民國九十七年七月

謝誌

在研究所學習的兩年，很快都過去了，雖然覺得還有很多東西沒有學習完整，但是在這些日子裡所得到的，的確也讓我此後人生將有所改變。不管是專業知識，還是人際關係上的學習，指導教授李宗徽 博士都不遺餘力的指導，深深佩服老師在做人處事上的修為，這都是讓我要更加要學習的部分。同時，老師上許多方面上的幫助與包容，也使得我能夠順利的完成學業，在此由衷的感謝指導教授李宗徽 博士。另外，感謝立德大學簡文達 博士，在海洋微生物實驗上教導了很多，並且給我很多建議與協助，也讓我對於實驗總是充滿興趣與熱誠。更要感謝口試委員盧重光 博士的悉心指正，讓本論文可以更加得以完整與正確。此外，也要感謝台大海洋所謝文陽 博士提供了機會讓我可以您的實驗室裡學習，並獲得很多好的經驗。

而在這兩年裡，要謝謝與我互相扶持的生藥所同學們，在一起學習的過程中，共同分享甘苦。尤其是台大海研所的同學們，旻曉、桓昌、建勳與思妤學姊，讓我在研究室裡，感受到許多溫暖與歡樂。還有研究室的學妹們，雅菁與瑜真所給予的適時支援與陪伴。另外要感謝北醫共儀中心王淑慧老師與台大貴儀中心黃守齡小姐，在光譜圖譜的實驗上給予我許多幫助，讓我能夠順利的將論文完成。

最後，感謝家裡的父母親無悔的付出，願意讓我繼續往上學習，提供我在經濟與精神上的支持，得以讓我完成這個階段的學業。此外，要感謝的人還太多，沒辦法一一的詳述，我能附上我最大誠意感謝這兩年幫助過我的師長與朋友們，謝謝各位的鼎力幫忙。

李翊弘 於北醫生藥所 2008 7 月

中文摘要

本研究利用瓊脂擴散法 (disc agar diffusion method) 來篩選105株台灣海洋細菌，藉以尋找出對抗藥性金黃色葡萄球菌 (Penicillin G-resistant *Staphylococcus aureus*, ATCC 11631) 具有抑制活性的海洋細菌。所得結果根據抑菌圈的大小判斷其中2株具較明顯的抑制活性，分別為#M1B (*Pseudomonas aeruginosa*) 和#AW52 (Rhodobacteraceae)。此外，所有海洋菌株萃取液在血管舒張活性 (vasorelaxing activities) 上，利用Phenylephrine誘發大鼠 (Sprague-Dawley Rat) 胸主動脈血管收縮，再以細菌醱酵液萃取物進行處理，得知其中2株菌之萃取物具有抑制血管收縮的活性，分別為#M1B (*P. aeruginosa*) 和#MO6 (*B. firmus*)。隨後將上述三株海洋菌以PY培養基擴大培養，針對其代謝物進行一系列的分析、分離、純化與結構解析，計分離出15個化合物，包括：兩個喹林生物鹼 (quinoline alkaloids)、兩個吩嗪生物鹼 (phenazine alkaloids)、五個芳香胺衍生物 (phenylamides derivatives)、六個環狀雙胺基酸 (diketopiperazines) 和 2-胺基苯乙酯 (2-aminophenyl acetate)。分別為：2-*n*-heptylquinol-4-one (1)、2-aminophenyl acetate (2)、cyclo-_L-Pro-_L-Phe (3)、cyclo-_L-Tyr-_L-Pro (4)、phenazine-1-carboxamide (5)、hydroxyphenazine (6)、*N*-(2'-Phenylethyl)isobutyramide (7)、2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide (8)、2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide (9)、*N*-(2'-phenylethyl)isovaleramide (10)、2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide

(11)、cyclo-L-Pro-L-Ile (12)、cyclo-L-Pro-L-Val (13)、cyclo-L-Pro-L-Leu (14) 和 cyclo-L-Pro-L-Met sulfoxide (15)，其中cyclo-L-Pro-L-Met sulfoxide (15) 是過去未曾報導過的新化合物。這些天然物純質更進一步進行抗菌活性試驗，結果顯示化合物1、5、6和11針對抗藥性金黃色葡萄球菌有明顯的抑制活性，其最小抑制濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) 分別為64、36、36和24 $\mu\text{g/ml}$ 。另外，細胞毒性檢測的結果顯示，化合物1和11具有顯著的細胞毒性，其對於 NPC-tw01、HCT-116、Jurkat和H661等四株癌細胞的半抑制濃度 (IC_{50}) 範圍介於 7.1 ~ 14.7 μM 。



Abstract

In this study, 105 strains of marine bacteria isolated from Taiwan were cultured for the screening of their antibacterial activities by disc agar diffusion method. Of these bacterial strains monitored, 2 strains exhibited antibacterial activities. Among them, bacterial strains M1B (*Pseudomonas aeruginosa*) and AW52 (Rhodobacteraceae) showed significant antibacterial activities toward Penicillin G-resistant *Staphylococcus aureus*. (ATCC 11631). Besides, all the marine bacterial extracts on vasorelaxing activities of SD rats induced by phenylephrine were also examined. Of these bacterial strains monitored, strains M1B (*P. aeruginosa*) and MO6 (*B. firmus*) exhibited vasorelaxing activities. Based on this findings, the 3 bacterial strains were mass cultured using PY broth. Then, the bioactive constituents were obtained by a series of chromatographic separation, and characterized by spectral analysis. Totally 15 compounds including 2 quinoline alkaloids, 2 phenazine alkaloids, 4 phenylamide derivatives, 6 diketopiperazines and a 2-aminophenyl acetate were isolated and identified. Their structures were elucidated to be 2-*n*-heptylquinol-4-one (**1**), 2-aminophenyl acetate (**2**), cyclo-_L-Pro-_L-Phe (**3**), cyclo-_L-Tyr-_L-D-Pro (**4**), hydroxyphenazine (**5**), phenazine-1-carboxamide (**6**), *N*-(2'-Phenylethyl)isobutyramide (**7**), 2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide (**8**), 2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide

(**9**), *N*-(2'-phenylethyl)isovaleramide (**10**), 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (**11**), cyclo-_L-Pro-_L-Ile (**12**), cyclo-_L-Pro-_L-Val (**13**), cyclo-_L-Pro-_L-Leu (**14**), and cyclo-_L-Pro-_L-Met sulfoxide (**15**). Among them, cyclo-_L-Pro-_L-Met sulfoxide (**15**) was isolated for the first time from the natural source. The bioactivities of all the pure entities were further evaluated. The results of biological tests indicated that **1**, **5**, **6** and **11** exhibited strong antibacterial activity toward resistant *S. aureus*, with minimum inhibitory concentrations (MIC) of 64, 36, 36 and 24 µg/ml, respectively. Additionally, **1** and **11** showed significant cytotoxic activities against NPC-tw01, HCT-116, Jurkat, and H661 cancer cell lines, with an IC₅₀ values from 7.1 to 14.7 µM.

總目錄

謝誌.....	0
中文摘要	2
Abstract.....	4
總目錄	6
表目錄	8
圖目錄	10
縮寫.....	14
壹 緒論與研究目的.....	15
1.1 海洋細菌之活性天然物的研究發展.....	15
1.2 三種海洋細菌天然物之文獻回顧.....	31
貳、實驗結果與討論.....	39
2.1.1 2- <i>n</i> -heptylquinol-4-one (1) 之結構解析.....	45
2.1.2 2-aminophenyl acetate (2) 之結構解析.....	52
2.1.3 cyclo- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Phe (3) 之結構解析	56
2.1.4 cyclo- <i>L</i> -Tyr- <i>L</i> -Pro (4) 之結構解析.....	63
2.1.5 Hydroxyphenazine (5) 的結構解析	68
2.1.6 Phenazine-1-carboxamide (6) 之結構解析	74
2.1.7 <i>N</i> -(2'-Phenylethyl)isobutyramide (7) 之結構解析	80
2.1.8 2-Ethyl- <i>N</i> -(2'-phenethyl)butyramide (8) 之結構解析	87
2.1.9 2-Methyl- <i>N</i> -(2'-phenylethyl)butyramide (9) 之結構解析.....	92
2.1.10 <i>N</i> -(2'-phenylethyl)isovaleramide (10) 之結構解析.....	96
2.1.11 2-heptyl-4-hydroxyquinoline- <i>N</i> -oxide (11) 之結構解析.....	104
2.1.12 cyclo- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Leu (12) 之結構解析.....	110
2.1.13 cyclo- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Val (13) 之結構解析.....	114
2.1.14 cyclo- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Ile (14) 之結構解析.....	118
2.1.15 cyclo- <i>L</i> -Pro- <i>L</i> -Met sulfoxide (15) 之結構解析.....	123
2.2 氨基酸水解分析結果.....	132
2.3 抑制抗藥性金黃色葡萄球菌生長之試驗結果.....	133
2.3.1 105 株海洋細菌初篩結果.....	133
2.3.2 抑制創傷弧菌及金黃色葡萄球菌生長之試驗結果.....	134
2.4 細胞毒性測試結果.....	136
2.5 討論.....	137
參、實驗部份.....	139
3.1 儀器設備與試劑.....	139
3.2 培養基配置.....	141

3.3 抑菌活性測試	142
3.3.1 瓊脂紙錠擴散試驗 (disc agar-diffusion test)	142
3.3.2 海洋細菌活性成分抑制抗藥性金黃色葡萄球菌之濃度測試	143
3.4 海洋菌株之萃取與分離	144
3.4.1 #M1B 之成份分離與純化	145
3.4.2 #MO6 之成份分離與純化	147
3.5 胺基酸水解分析	151
3.6 各成分之物理數據	152
參考文獻	160



表目錄

表 1、自不同環境單離出之海洋菌株及其活性代謝產物的文獻整理。	17
表 2、綠膿桿菌所分離得到的天然物之文獻整理。	31
表 3、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 1	47
表 4、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 2	53
表 5、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 3	58
表 6、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 4	64
表 7、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 5	69
表 8、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 6	75
表 9、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 7	81
表 10、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 8	88
表 11、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 9	93
表 12、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 10	98
表 13、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 11	106
表 14、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 12	111
表 15、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 13	115
表 16、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 14	119
表 17、 ¹ H- and ¹³ C-NMR data of 15	125
表 18、胺基酸分析結果。	132

表 19、海洋細菌菌液萃取液汁抗菌活性初篩結果。	133
表 20、化合物 1~15 對金黃色葡萄球菌之最小抑制濃度	135
表 21、化合物 1~5 及 7~11 抑制人類多種癌細胞生長之 IC ₅₀	136
表 22、本研究中所使用之各種培養基配方。	141
表 23、#M1B 乙酸乙酯萃出物以膠濾管柱層析分離結果	145
表 24、#MO6 乙酸乙酯萃出物以膠濾管柱層析分離結果	147
表 25、#AW52 乙酸乙酯萃出物以膠濾管柱層析分離結果	149



圖目錄

圖 1、 #MIB 菌株培養液之乙酸乙酯萃取物分離流程.....	40
圖 2、 #MO6 菌株培養液之乙酸乙酯萃取物分離流程.....	41
圖 3、 #AW52 菌株培養液之乙酸乙酯萃取物分離流程.....	41
圖 4、 化合物 1 之電噴灑電離質譜。	47
圖 5、 化合物 1 之紅外光譜。	48
圖 6、 化合物 1 之紫外光譜。	48
圖 7、 化合物 1 之氫譜。	49
圖 8、 化合物 1 之碳譜。	49
圖 9、 化合物 1 之 COSY 圖譜。	50
圖 10、 化合物 1 之 HMBC 圖譜.....	51
圖 11、 化合物 2 之電噴灑電離質譜。	53
圖 12、 化合物 2 之紅外光譜。	54
圖 13、 化合物 2 之紫外光譜。	54
圖 14、 化合物 2 之氫譜。	55
圖 15、 化合物 2 之碳譜。	55
圖 16、 化合物 3 之電噴灑電離質譜。	58
圖 17、 化合物 3 之紅外光譜。	59
圖 18、 化合物 3 之紫外光譜。	59

圖 19、化合物 3 之氫譜。	60
圖 20、化合物 3 之碳譜。	60
圖 21、化合物 3 之 COSY 圖譜。	61
圖 22、化合物 3 之 HMBC 圖譜。	62
圖 23、化合物 4 之電噴灑電離質譜。	65
圖 24、化合物 4 之紅外光譜。	65
圖 25、化合物 4 之紫外光譜。	66
圖 26、化合物 4 之氫譜。	66
圖 27、化合物 4 之碳譜。	67
圖 28、化合物 5 之電噴灑電離質譜。	70
圖 29、化合物 5 之紅外光譜。	70
圖 30、化合物 5 之紫外光譜。	71
圖 31、化合物 5 之氫譜。	71
圖 32、化合物 5 之碳譜。	72
圖 33、化合物 5 之 COSY 圖譜。	72
圖 34、化合物 5 之 HMBC 圖譜。	73
圖 35、化合物 6 之電噴灑電離質譜。	76
圖 36、化合物 6 之紅外光譜。	76
圖 37、化合物 6 之紫外光譜。	77

圖 38、化合物 6 之氫譜。	78
圖 39、化合物 6 之碳譜。	79
圖 40、化合物 7 之電噴灑電離質譜。	82
圖 41、化合物 7 之紅外光譜。	82
圖 42、化合物 7 之紫外光譜。	83
圖 43、化合物 7 之氫譜。	83
圖 44、化合物 7 之碳譜。	84
圖 45、化合物 7 之 COSY 圖譜。	85
圖 46、化合物 7 之 HMBC 圖譜。	86
圖 47、化合物 8 之電噴灑電離質譜。	89
圖 48、化合物 8 之紅外光譜。	89
圖 49、化合物 8 之紫外光譜。	90
圖 50、化合物 8 之氫譜。	90
圖 51、化合物 8 之碳譜。	91
圖 52、化合物 9 之電噴灑電離質譜。	94
圖 53、化合物 9 之紅外光譜。	94
圖 54、化合物 9 之紫外光譜。	95
圖 55、化合物 9 之氫譜。	95
圖 56、化合物 10 之電噴灑電離質譜。	98

圖 57、化合物 10 之紅外光譜。	99
圖 58、化合物 10 之紫外光譜。	99
圖 59、化合物 10 之氫譜。	100
圖 60、化合物 10 之碳譜。	101
圖 61、化合物 10 之 COSY 圖譜。	102
圖 62、化合物 10 之 HMBC 圖譜。	103
圖 63、化合物 11 之電噴灑電離質譜。	106
圖 64、化合物 11 之紅外光譜。	107
圖 65、化合物 11 之紫外光譜。	107
圖 66、化合物 11 之氫譜。	108
圖 67、化合物 11 之碳譜。	109
圖 68、化合物 12 之電噴灑電離質譜。	112
圖 69、化合物 12 之紅外光譜。	112
圖 70、化合物 12 之氫譜。	113
圖 71、化合物 12 之碳譜。	113
圖 72、化合物 13 之電噴灑電離質譜。	116
圖 73、化合物 13 之紅外光譜。	116
圖 74、化合物 13 之氫譜。	117
圖 75、化合物 13 之碳譜。	117

圖 76、化合物 14 之電噴灑電離質譜。	120
圖 77、化合物 14 之紅外光譜。	120
圖 78、化合物 14 之氫譜。	121
圖 79、化合物 14 之碳譜。	122
圖 80、化合物 15 之電噴灑電離質譜。	126
圖 81、化合物 15 之紅外光譜。	126
圖 82、化合物 15 之氫譜。	127
圖 83、化合物 15 之碳譜。	128
圖 84、化合物 15 之 COSY 圖譜。	129
圖 85、化合物 15 之 HMBC 圖譜。	130
圖 86、化合物 15 之 HSQC 圖譜。	131
圖 87、化合物 15 的兩個立體異構物。	131

縮寫

COSY	Correlation Spectroscopy
ESI/MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
HMBC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple-Bond Coherence
HSQC	¹ H-Detected Heteronuclear Single-Quantum Coherence
NOESY	Nuclear Overhauser and Enhancement Spectroscopy

壹 緒論與研究目的

1.1 海洋細菌之活性天然物的研究發展

在現今既有的醫療用藥裡，據統計約有一半是開發自天然資源，足見天然物在未來新藥開發上仍扮演重要的角色，其中由海洋中所找到的天然物更是具有高度的發展潛力¹。綜觀過去相關於天然物研究的文獻顯示，由海洋生物所得到的天然物與自陸生生物所得到的在化學結構上常存有很大的差異，推究其原因可能是由於海洋的高壓、高鹽和低溫環境下，生物體經長期的演化，發展出獨特的代謝系統，以因應週遭環境的改變，使海洋生物得以生存。自 1976 年首次由 Ruggieri 提出，海洋生物可望成為新藥來源的概念，此後陸續有不少文獻指出從海洋裏所提萃出的天然物，具有非常強效的生物活性，包括：抗菌²、抗腫瘤³、抗發炎⁴和抗瘧疾⁵。近年來，新的證據顯示，在已知的海洋天然物中，多種結構較為特殊且具有強生理活性的化合物，如：河豚毒素 (Tetrodotoxin, TTX)(1)、海葵毒素 (Palytoxin)(2)、黑海綿酸 (okadaic acid)(3)、星孢菌素 (Staurosporine)(4) 和嘔吐毒素 (cereulide)(5) 等均是海洋微生物所得到^{6,7,8,9,10,11}，逐見海洋微生物應是天然物研究中另一重要的標的。而在海洋中約有 200 萬到 2 億種微生物，平均由海平面每往下 10 平方公尺，即有 10 萬種微生物存在。有些細菌會附著、共生於海洋的動植物體表或腸道內。儘管有許多海洋微生物是由陸地上經由河水、雨水或空氣傳播到海洋中，但由於海洋環境的特殊性就造就了海洋微生物高度的

多樣性，也代謝出更多不同於陸地的特殊產物。

在過去，海洋微生物的研究發展很緩慢，探究其原因為海洋資源的多樣性、鑑種的不易與採集技術上的困難。但近幾年來，由於生物技術的發展迅速，使得在微生物的鑑定與保種上得以更加簡易方便，同時天然物分離與結構鑑定的技術也提升不少，讓一些存在於海洋微生物中極其微量的化合物得以被發現，再加上新的海洋生物技術與發酵工程、細胞工程等知識的持續快速累積，對於大量培育海洋微生物作為藥源的成功機會又更加提升。鑑於此，對於這些存在於特殊環境的微生物，以及更多具有新穎代謝產物能力的菌種，將會被陸續發掘出來。

已知由海洋微生物所得到的次級代謝物中，其化學結構也存在著高度的多樣性，包括了萜類 (terpene)、胜肽類 (peptide)、生物鹼 (alkaloid)、巨環內酯類 (macrolide) 與聚醚 (polyether) 類等。自 1966 年由 Burkholder 由海洋假單胞桿菌 (*Pseudomonas*) 分離到抗生素吡咯尼林 (Pyrrolnitrin)(6) 後¹²，由海洋微生物去尋找抗癌藥物的研究才被科學家們所正視。接著陸續由海底污泥、海洋動植物體表及其腸胃中分離得到一些具有抗菌、抗發炎和抗癌的海洋細菌 (表 1)。其中較顯著的是已上市的一種抗菌劑，是由黃桿菌屬 (*Flavobacterium*) 所得到的，這株海洋細菌所產生的一種胞外多醣 Marinactan，對於抑制癌細胞生長有很強的活性，可以完全抑制轉移腫瘤細胞的生長，延長壽命，並且在體外有能刺激淋巴細胞轉化作用

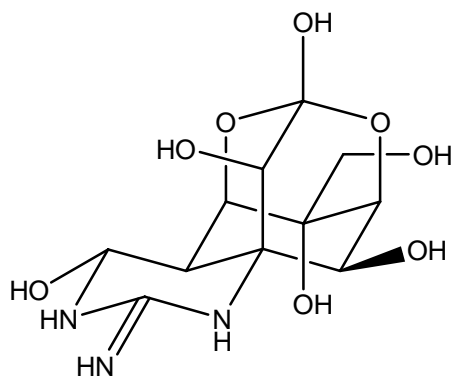
(biotransformation) 及活化巨噬細胞 (macrophage) 的能力⁹；由海底泥砂分離得到海洋細菌 *Alteromonas* sp. 得到生物鹼 Alteramide A (7)，是一個新型的內醯胺 (Lactam)，具有抗 P388 白血病、L1210 淋巴瘤和 KB 人類皮膚癌的生物活性¹³；由海洋魚類 *Halichoeres bleekeri* 的腸胃道所分離的鏈黴菌 (*Streptomyces hygroscopicus*) 得到 Halichomycin (8) 具有很強的細胞毒性，並對 P388 白血病有抑制活性¹⁴；由加州深海沉積物中所分離到的深海細菌，分離到大環內酯類的 Macrolactins A (9)，具有抑制 B16-F10 鼠黑色素瘤的活性，並且具有抑制單純疱疹病毒及人類免疫缺陷病毒 (HIV) 的能力¹⁵。

台灣四面環海，得天獨厚的環境，俾利於海洋微生物的研究，基於此原因，本研究針對台灣海域所分離得到的純株海洋細菌，經由初步的抗菌與抗血管收縮活性檢測後，得到 3 株具有活性的海洋細菌，包含一株綠膿桿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, M1B)、一株堅強芽孢桿菌 (*Bacillus firmus*, MO6) 和一株紅桿菌科新屬 (*Rhodobacteraceae.*, AW52)，並針對這 3 株海洋細菌加以大量培養，進行其次級活性代謝物之探究。

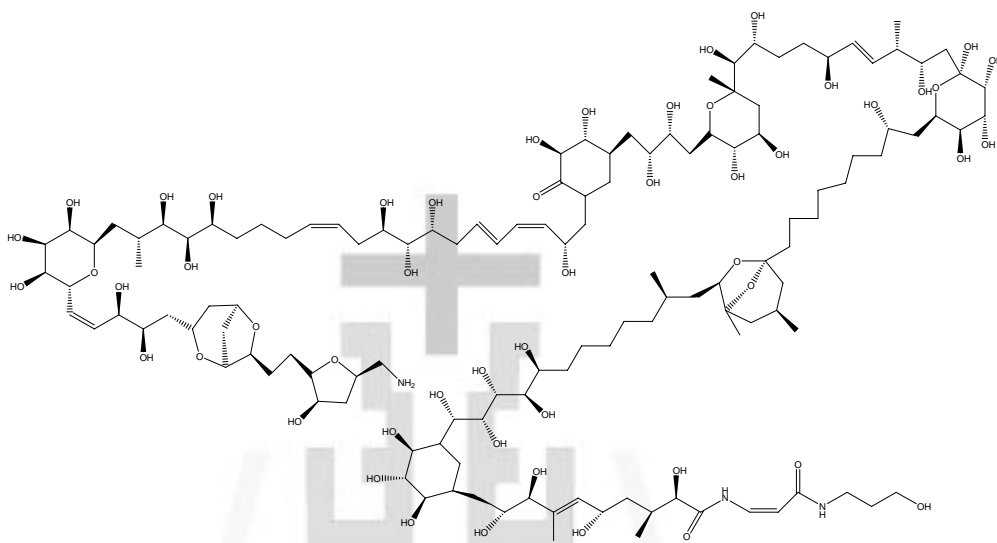
表 1、自不同環境單離出之海洋菌株及其活性代謝產物的文獻整理。

菌株	菌種來源	天然物
抗癌		
<i>Actinomycete</i>	海洋沉積物	Lagunapyrones (10) ¹⁶
<i>Alteromonas haloplanktis</i>	海洋沉積物	Bisucaberin (11) ¹⁷
<i>Alteromonas</i> sp.	海棉	Alteramide (12) ¹⁸
<i>Bacillus cereus</i>	軟體動物	Homocereulide (13) ¹⁹
<i>Bacillus</i> sp.	海洋沉積物	Halobacillin (14) ¹²
<i>Bacillus</i> sp.	海洋沉積物	Isocoumarin (15) ²⁰

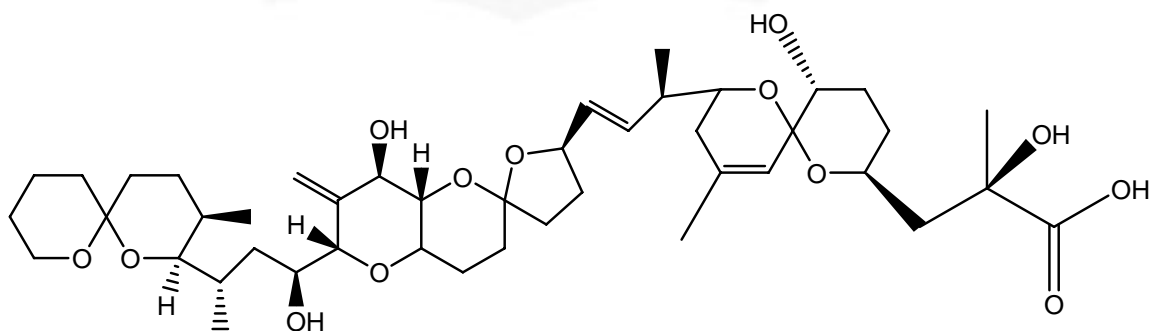
<i>Chaina purpurogena</i>	海洋沉積物	SS-228Y (16) ²¹
<i>Flavobacterium uliginosum</i>	黃桿菌	Marinactan ¹⁴
<i>Micromonospora</i> sp.	軟珊瑚	Thiocoraline (17) ²²
<i>Pelagiobacter</i> sp.	海藻	Pelagiomicins (18) ²¹
<i>Streptomyces hygrosopicus</i>	魚類消化道	Halichomycin (19) ²³
<i>Streptomyces sioyaensis</i>	海洋沉積物	Altemicidin (20) ²²
<i>Streptomyces</i> sp.	軟珊瑚	Octalacins (21) ²⁴
<i>Streptomyces</i> sp.	海洋沉積物	γ -Indomycinone (22) ²⁵
<i>Streptomyces</i> sp.	海洋沉積物	δ -Indomycinone (23) ²⁵
<i>Streptomyces</i>	軟體動物	Aburatubolactam C (24) ²⁴
<i>Vibrio</i> sp.	浮木	Acyldepsipeptide (25) ²⁶
抗菌		
<i>Actinomycete</i>	海洋沉積物	Marinone (26) ²⁷
<i>Alcaligenes faecalis</i>	軟體動物	B-1015 (27) ²⁸
<i>Alteromonas rava</i>	海水	Thiomarinol (28) ²⁹
<i>Bacillus</i> sp.	海洋蠕蟲	Loloatins (29) ³⁰
<i>Chromobacterium</i> sp.	海綿	Bromopyrroles (30) ²⁸
<i>Maduromycete</i>	海洋沉積物	Maduralide (31) ³¹
<i>Pseudoalteromonas</i>	海藻	Korormicin (32) ³²
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	海棉	Diketopiperazine (33) ³³
<i>Pseudomonas bromoutilis</i>	海草	Pentabromopseudilin (34) ³⁴
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	海鞘	Andrimid (35) ³⁵
<i>Pseudomonas</i> sp.	海草	Massetolides A (36) ³⁶
<i>Streptomyces griseus</i>	海洋沉積物	Aplasmomycins (37) ³⁷
<i>Streptomyces</i> sp.	海棉	Urauchimycins (38) ³⁸
<i>Streptomyces tenjimariensis</i>	海洋沉積物	Istamycins (39) ³⁹
<i>Streptomycete</i>	海洋沉積物	Wailupemycins (40) ⁴⁰
<i>Vibrio gazogenes</i>	海洋沉積物	Magnesidins (41) ⁴¹
抗發炎		
<i>Actinomycete</i>	海蜇皮	Salinamides (42) ⁴²



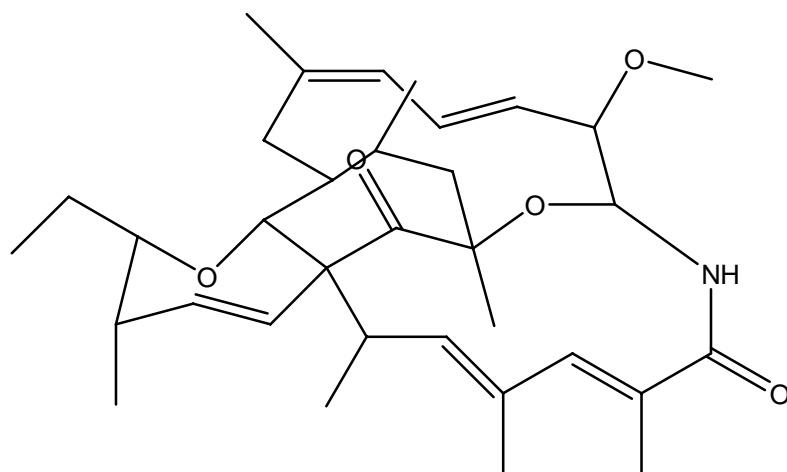
1



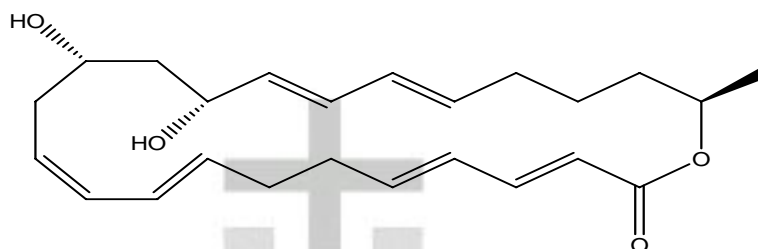
2



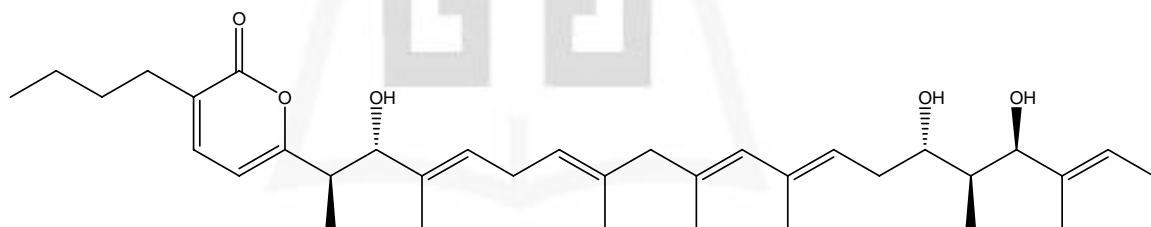
3



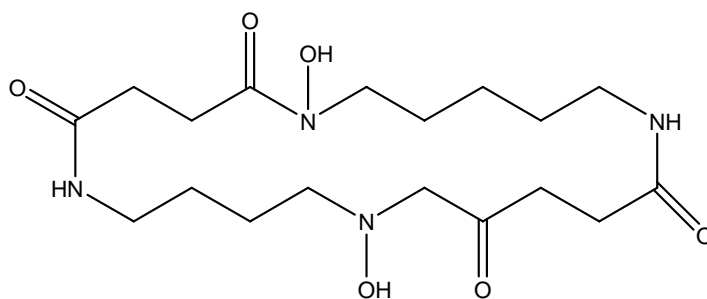
8



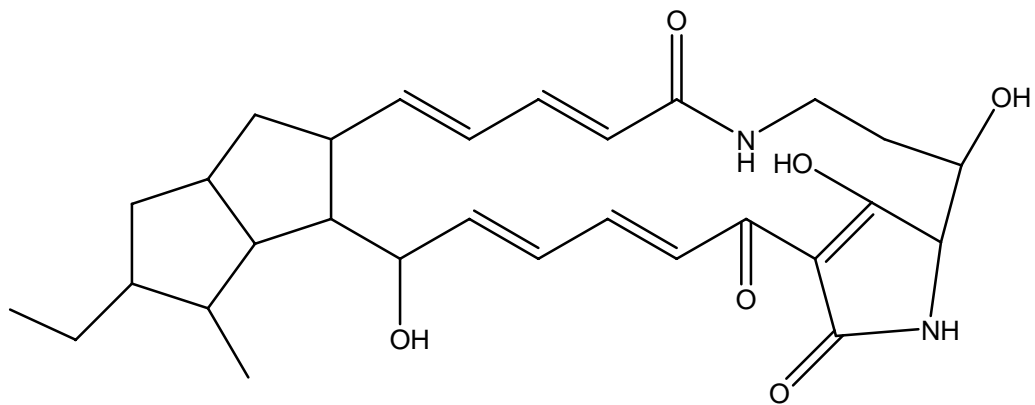
9



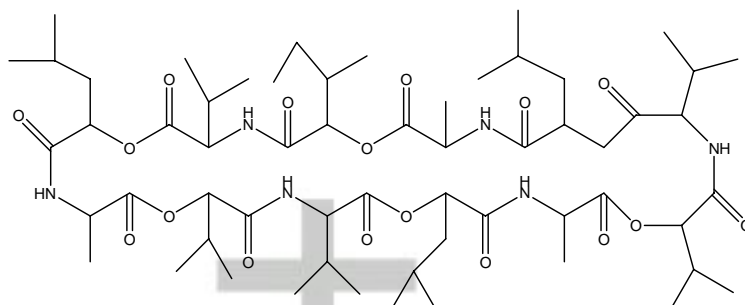
10



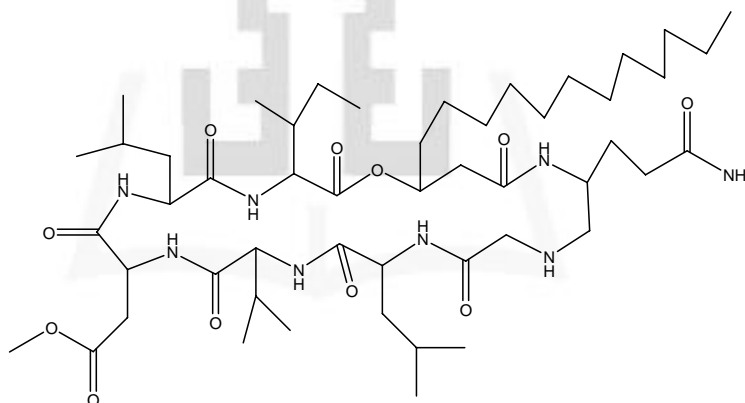
11



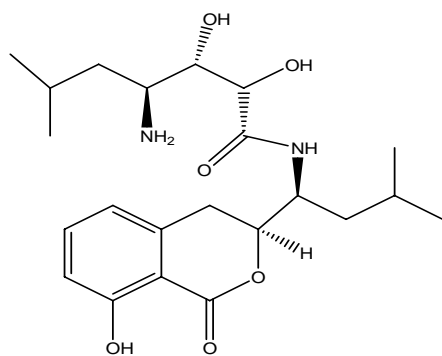
12



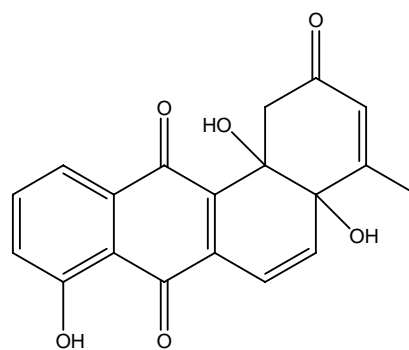
13



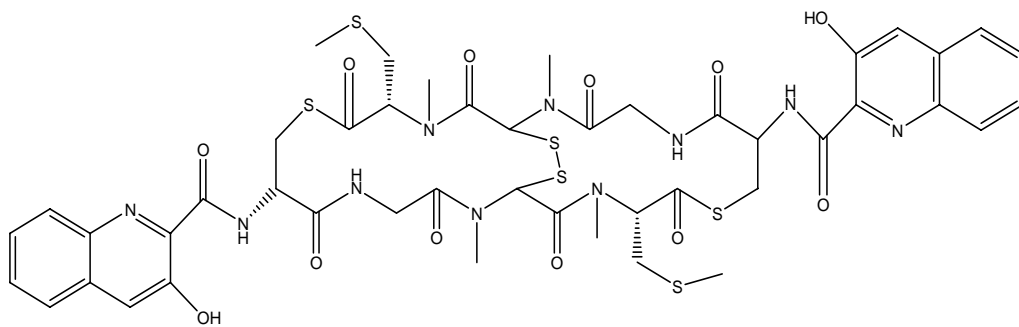
14



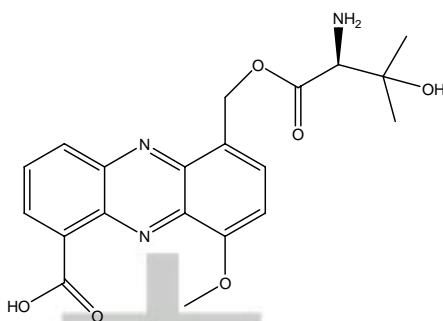
15



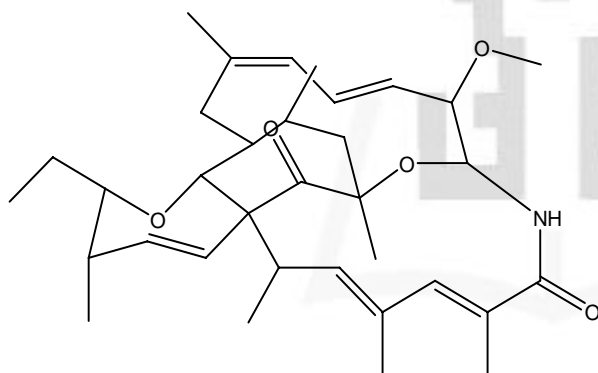
16



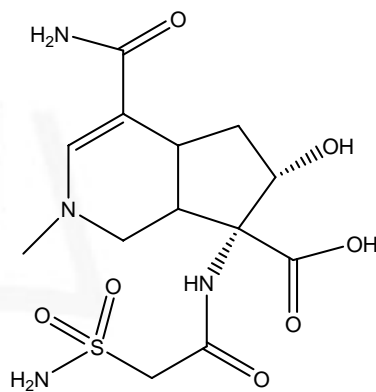
17



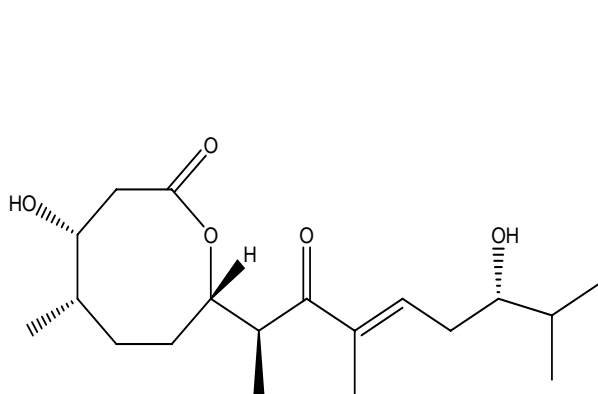
18



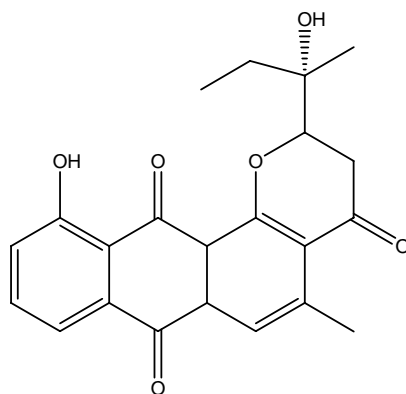
19



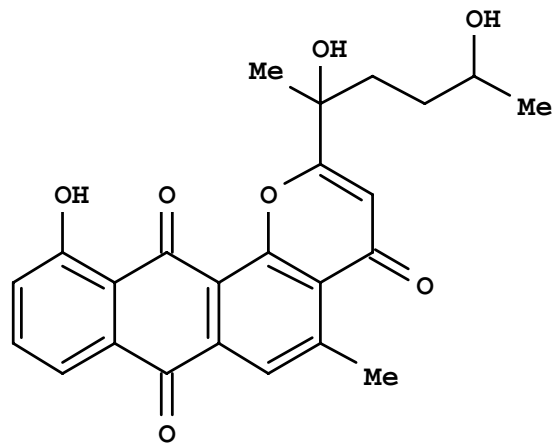
20



21

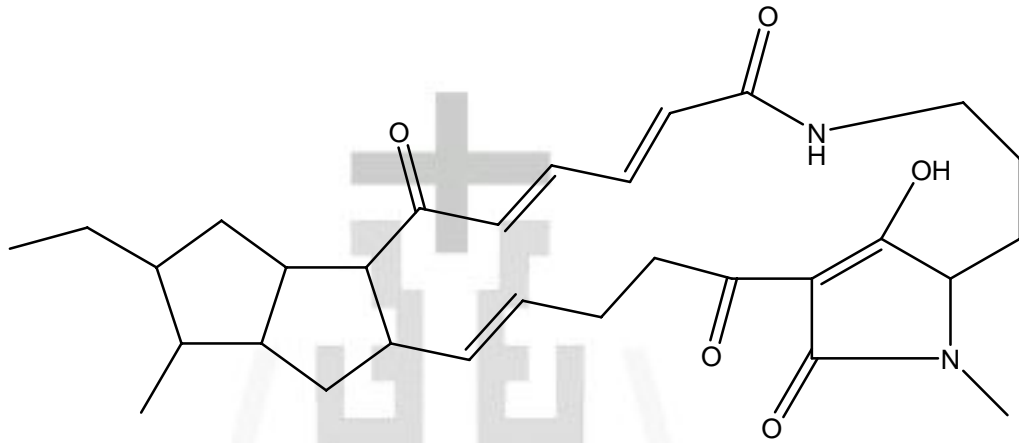


22

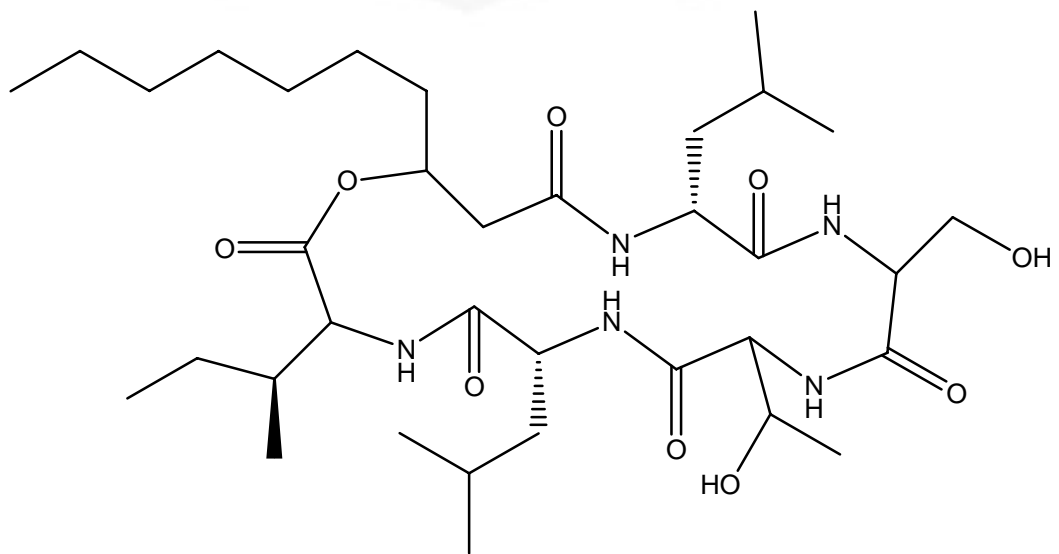


I

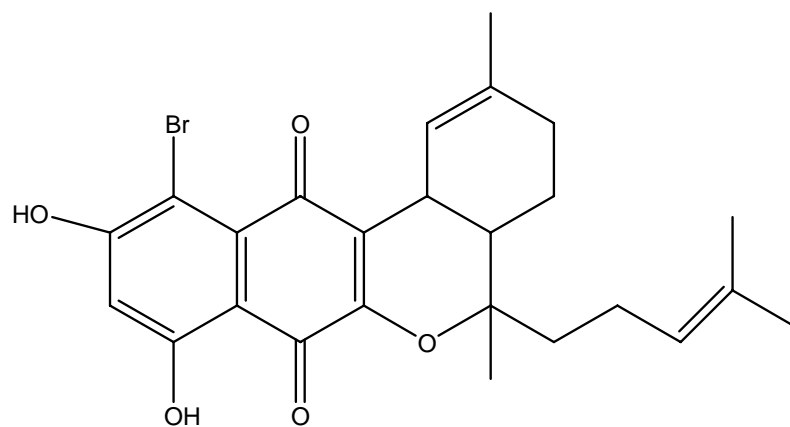
23



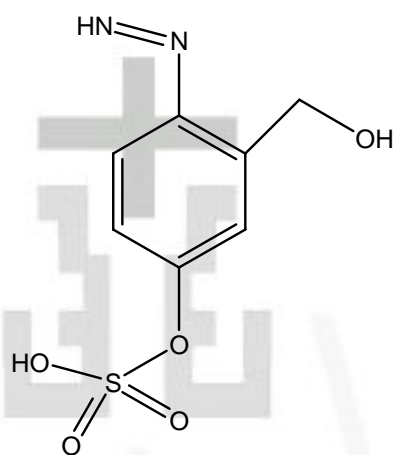
24



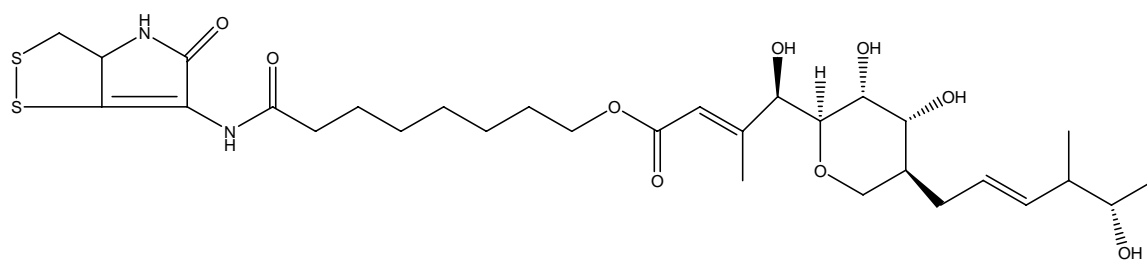
25



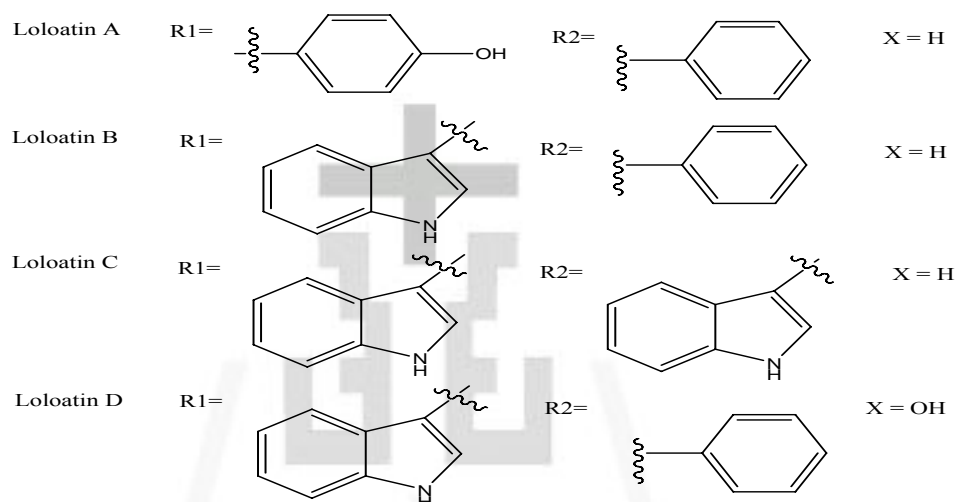
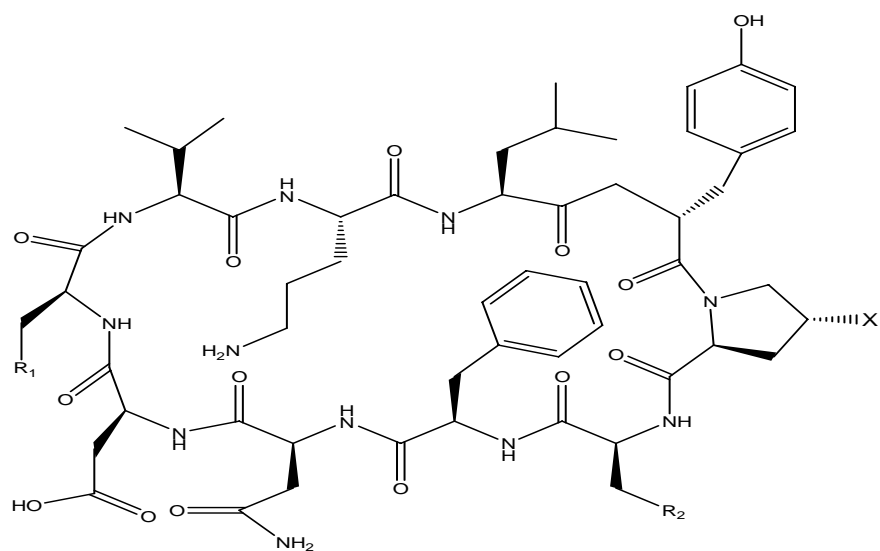
26



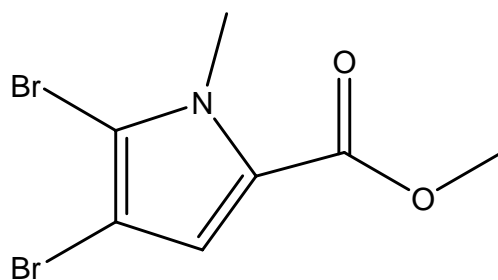
27



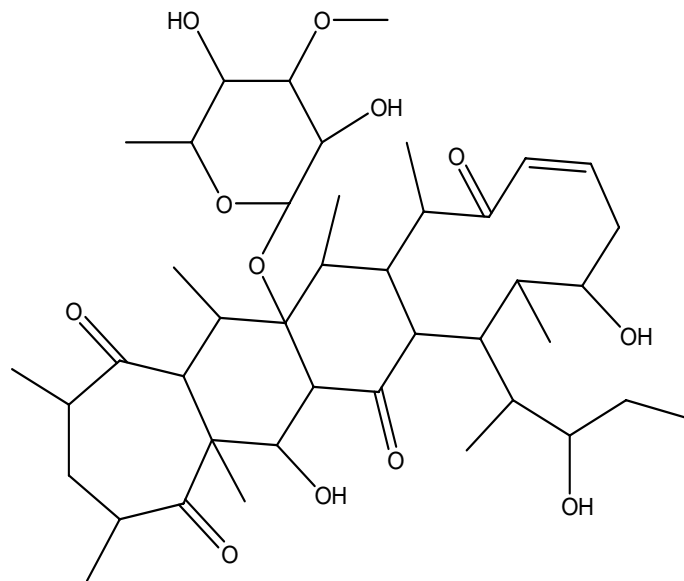
28



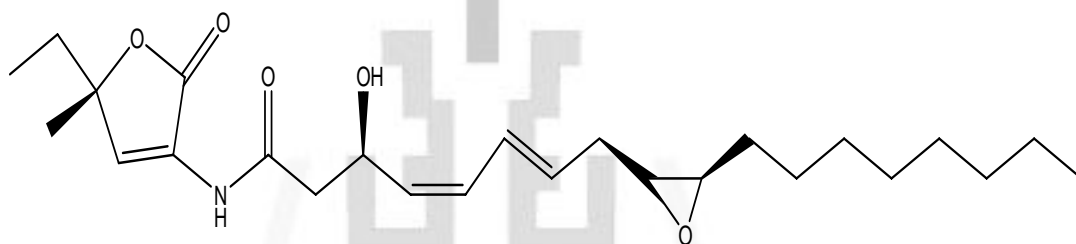
29



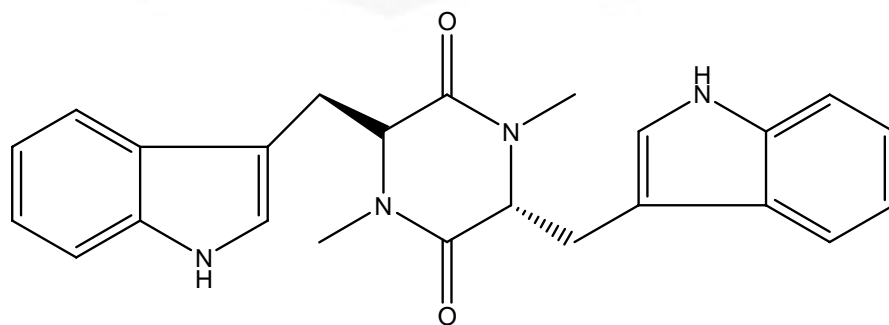
30



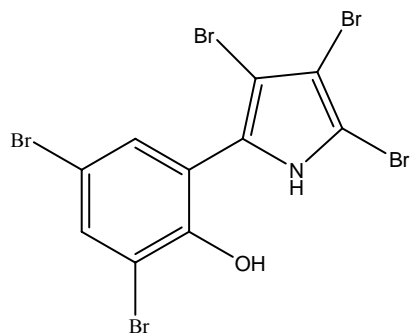
31



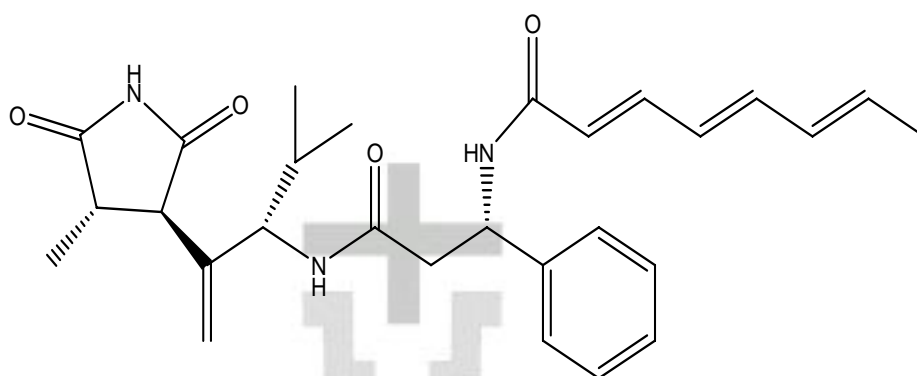
32



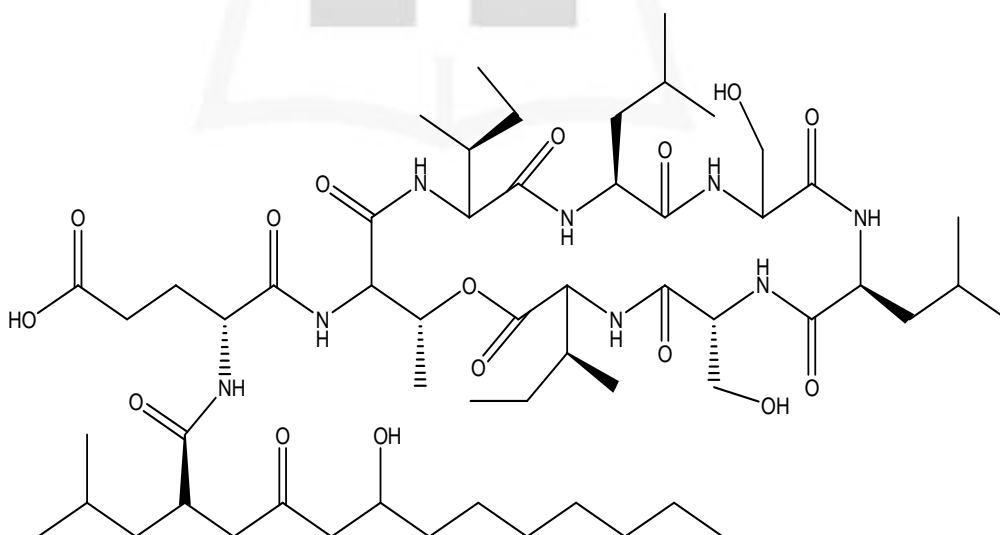
33



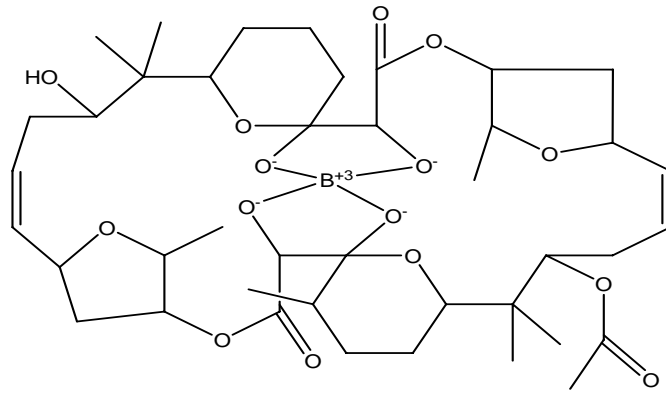
34



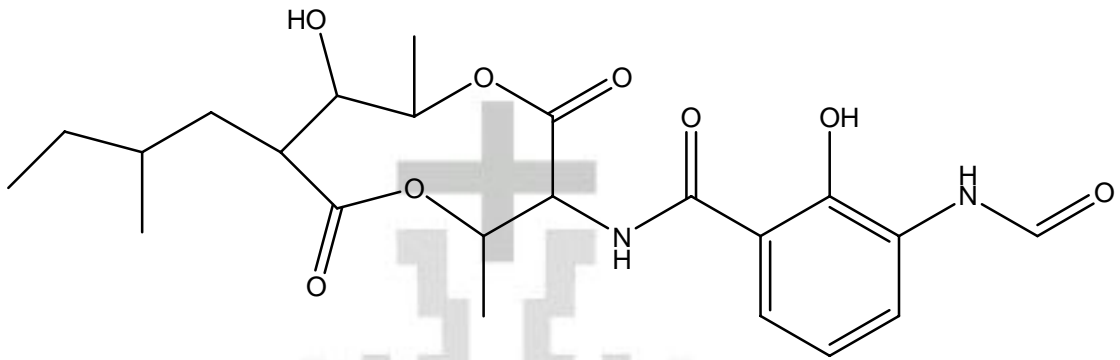
35



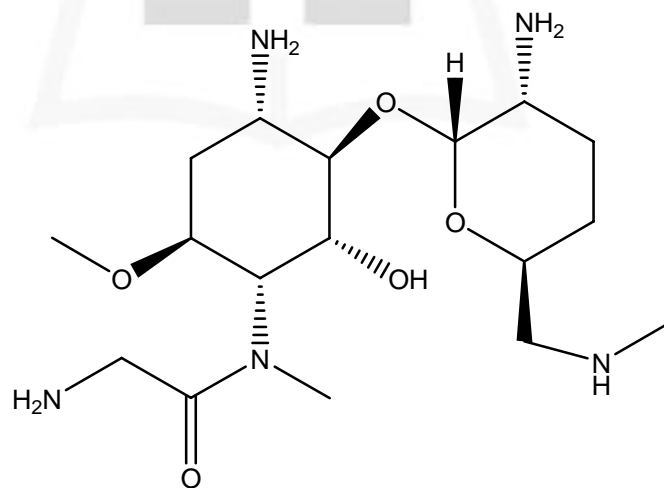
36



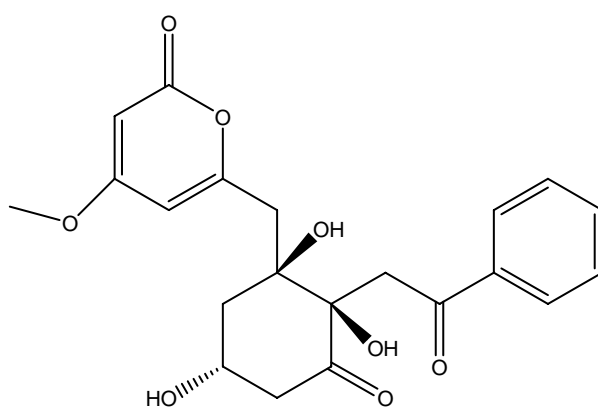
37



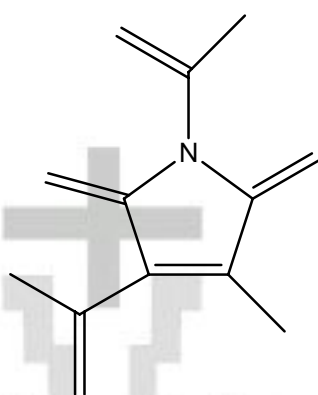
38



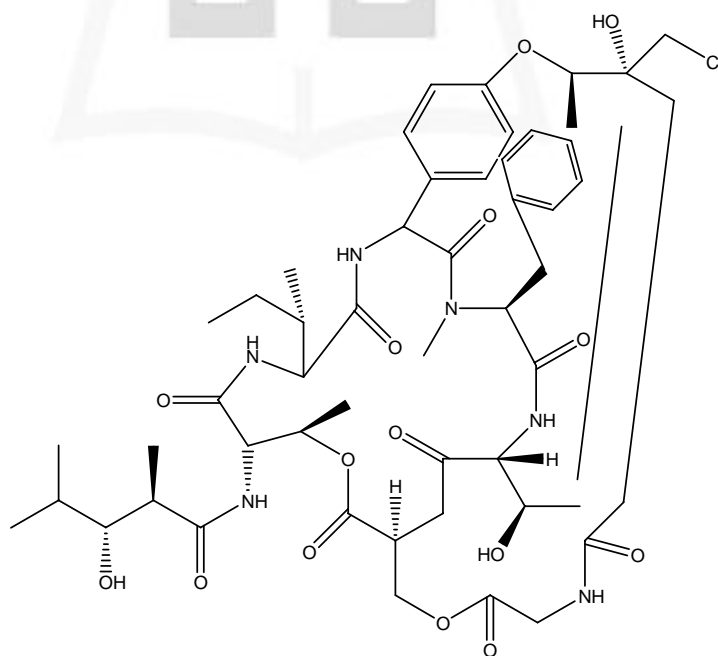
39



40



41



42

1.2 三種海洋細菌天然物之文獻回顧

在本論文中，針對一株綠膿桿菌 (*P. aeruginosa*, #M1B)、一株堅強芽孢桿菌 (*B. firmus*, #MO6) 和一株紅桿菌科新種 (Rhodobacteraceae, #AW52) 所生成的次級代謝物進行研究。堅強芽孢桿菌與新種紅桿菌屬未有被發表次級代謝物的文獻。

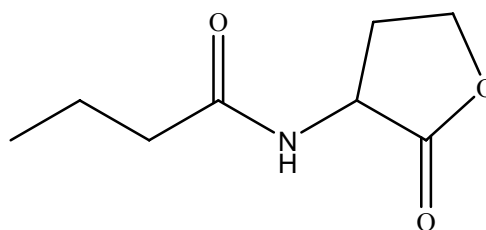
在過去的觀念中，綠膿桿菌常是被當作一種破壞免疫系統的病菌，常發生在燒燙傷、傷口及血液感染，故常被當作抗菌活性試驗的主要目標病菌。而自1960起陸續由綠膿桿菌中分離出一系列天然物，其中部分的天然物擁有不錯的生物活性，包括抗菌、抗癌及抗病毒等。而今尚有一些研究人員對此菌種做研究，期待能夠發現更多的活性天然物。有鑒於此，我們將過往自綠膿桿菌所發現的天然物加以整理，以為後續海洋綠膿桿菌天然物研究之參考。而紅桿菌科新屬菌雖未有文獻報導具天然物之研究，但是在其親緣關係相近的玫瑰桿菌屬 (*Roseobacter* sp.) 則發現一個具有強抗菌能力的天然物 tropodithietic acid (**84**)⁴³。

表 2、綠膿桿菌所分離得到的天然物之文獻整理。

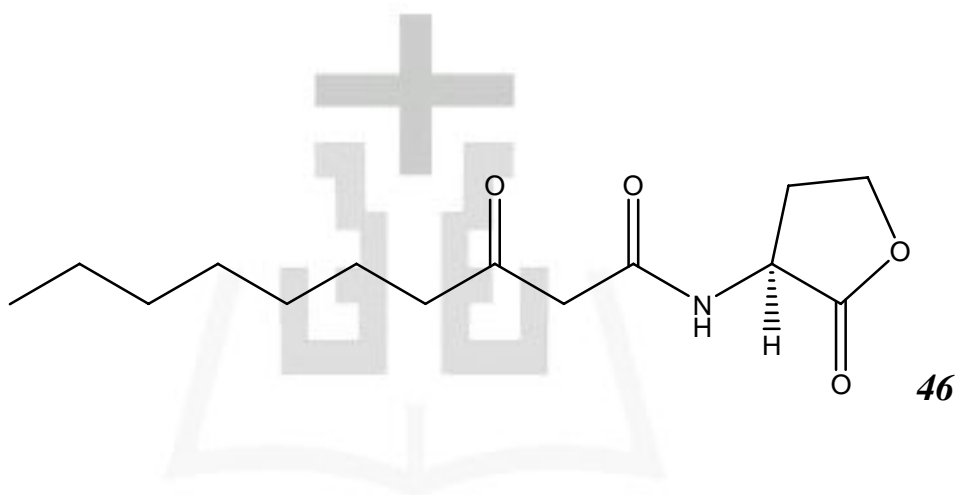
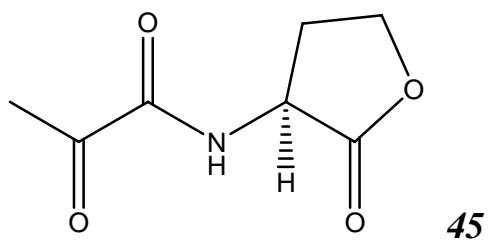
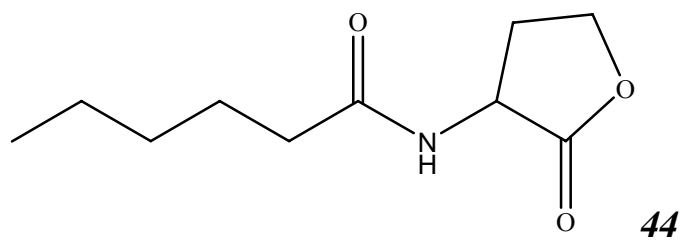
Structure analog	Compound name ^{Ref}
Lactone analog	<i>N</i> -butanoyl-L-homoserine lactone (BHL) (43) ⁴⁴ <i>N</i> -hexanoyl-L-homoserine lactone (HHIL) (44) ⁴⁴ <i>N</i> -(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (OHHL) (45) ⁴⁴ <i>N</i> -(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone, (OdDHL) (46) ⁴⁴
Peptide analog	2,3-de-epoxy-2,3-didehydro-rhizoxin (47) ⁴⁵ diketopiperazine (DKP) (48~54) ⁴⁶ pyoverdine I (55~57) ⁴⁷
Alkaloids analog	phenazine- α -carboxamide (58) ⁴⁸

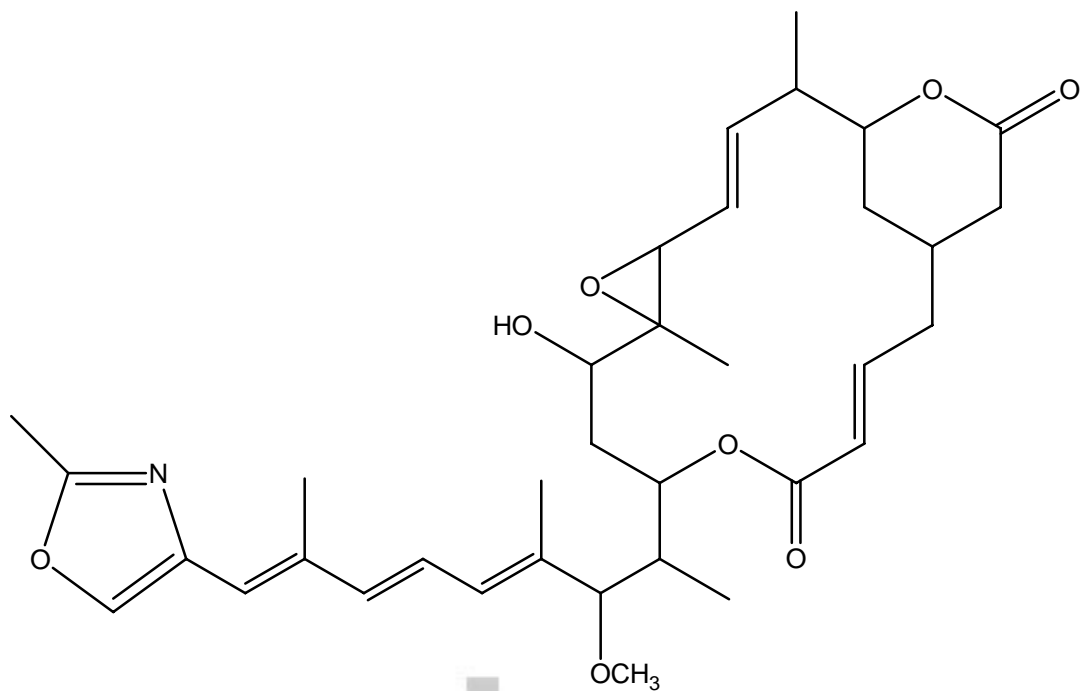
	<p>2-<i>n</i>-heptylquinol-4-one (59)⁴⁸ 2-<i>n</i>-nonylquinol-4-one (60)⁴⁸ 2-<i>n</i>-(1' E-nonyl)-quinol-4-one (61)⁴⁸ 3-<i>n</i>-heptyl-3-hydroxyquinolin-2,4-dione (62)⁴⁸ 2-<i>n</i>-heptyl-1,2,4-trihydroxyquinoline (63)⁴⁸ 4-hydroxy-2-alkylquinolines, (HAQs) (64)⁴⁸ 2-(2'-hydroxyphenyl)-4-hydroxymethyl thiazole (65)⁴⁸ 2-(2'-hydroxyphenyl) thiazole (66)⁴⁸ (2'-hydroxyphenyl)-4-carboxaldehyde thiazole. (67)⁴⁸ aeruginoic acid (68)⁴⁸ phenazine-1-carboxylic Acid (69)⁴⁴ phenazine-1-carboxamide (70)⁴⁸ pyocyanin (71)⁴⁹ pyrrolnitrin (72)⁵⁰ pyoluteorin (73)⁵¹ (+)-aerothionin (74)⁴⁸ homoaerothionin (75)⁴⁸ pyochelin (76)⁵²</p>
Halide analog	<p>dibromoverongiaquinol (77)⁴⁸ bromochloroverongiaquinol (78)⁴⁸ dichloroverongiaquinol (79)⁴⁸ (+)-aerophysinin-1 (80)⁴⁸</p>
Glucoside analog	<p>rahamnolipid (81)⁴⁵</p>
Benzenoid derivatives	<p>2,4-diacetylphloroglucinol (82)⁴⁵ 2-hexyl-5-propyl resorcinol (83)⁴⁵</p>

Lactone analog



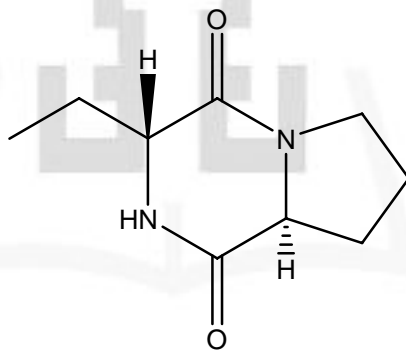
43



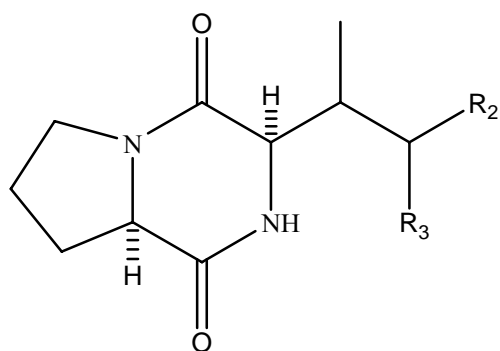


47

Peptide analog



48

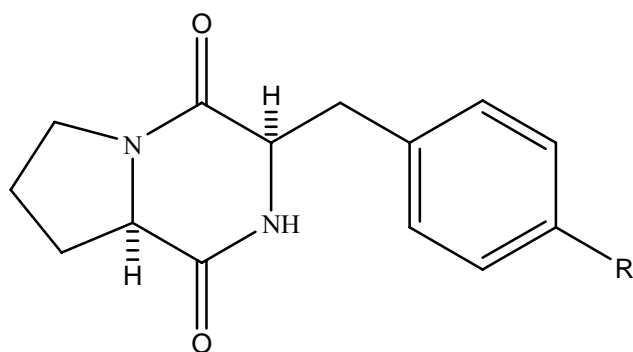


R₁ = CH₃; R₂ = R₃ = H; **49**

R₁ = H; R₂ = R₃ = CH₃; **50**

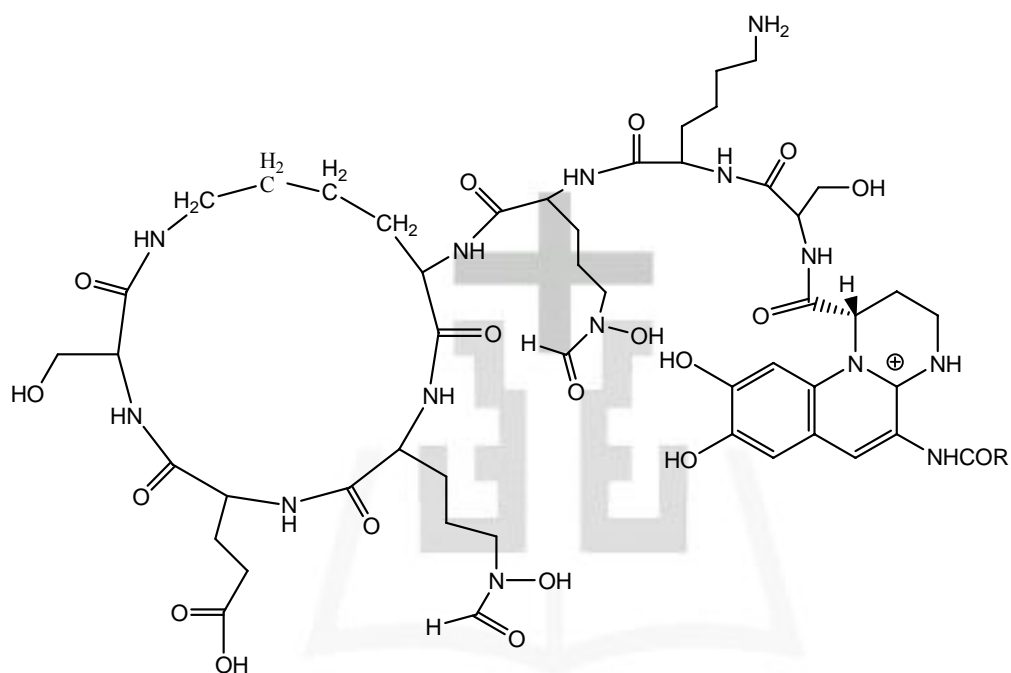
R₁ = R₂ = CH₃; R₃ = H; **51**

R₁ = R₂ = H; R₃ = SCH₃; **52**



R = H; **53**

R = OH; **54**



R = CH₂-CH₂-CO-COOH

R = CH₂-CH₂-CHNH₂-COOH

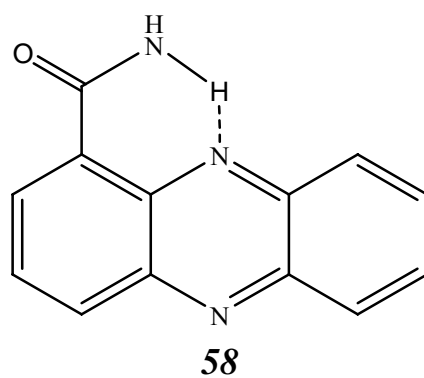
R = CH₂-CH₂-COOH

Pyoverdine Ia **55**

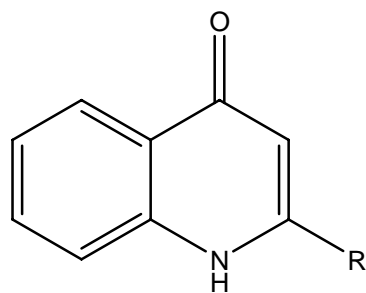
Pyoverdine Ib **56**

Pyoverdine Ic **57**

Alkaloids analog

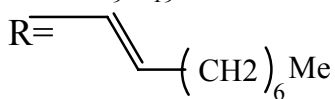


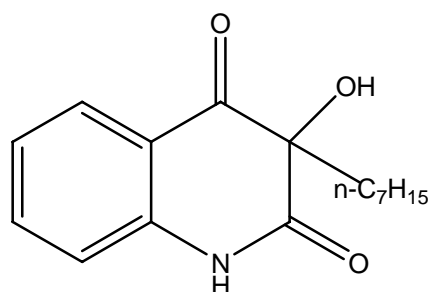
58



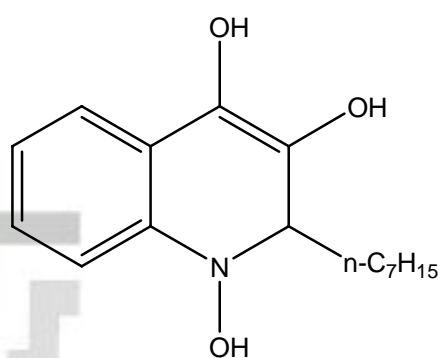
R=n-C₇H₁₅ **59**

R=n-C₉H₁₉ **60**

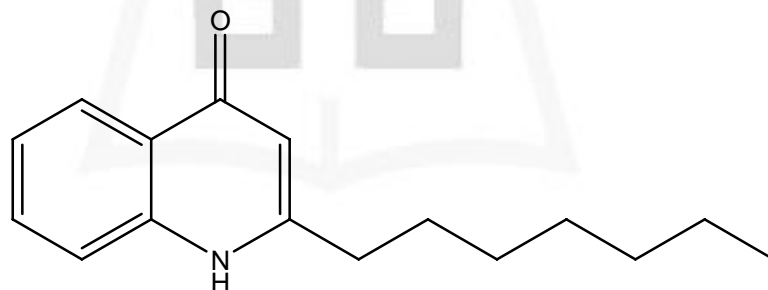
R=  **61**



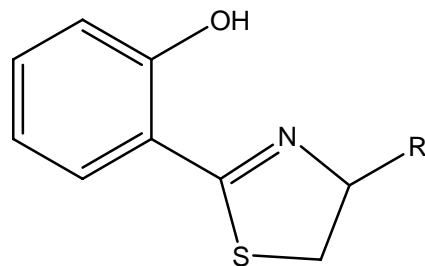
62



63



64

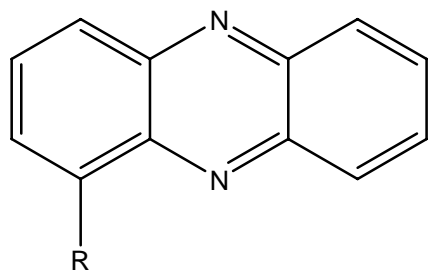


R=CH₂OH; **65**

R=H; **66**

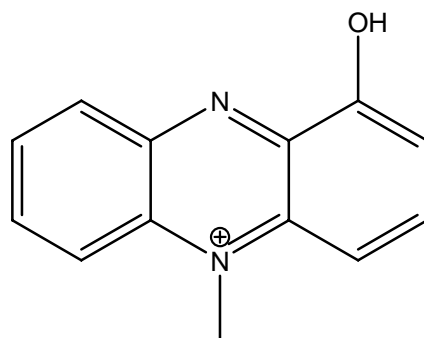
R=CHO; **67**

R=COOH; **68**

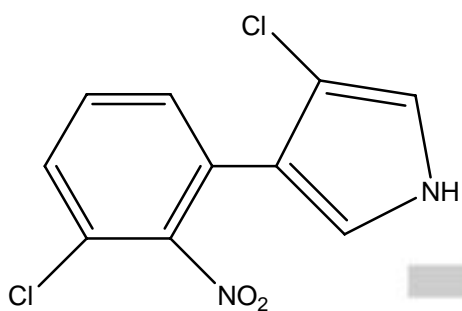


R=CO₂H; **69**

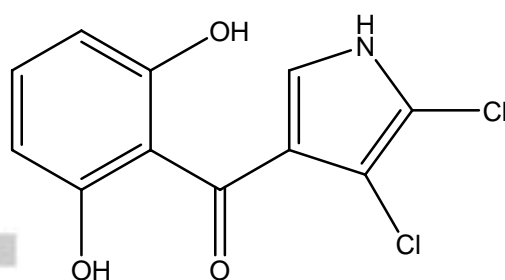
R=CONH₂; **70**



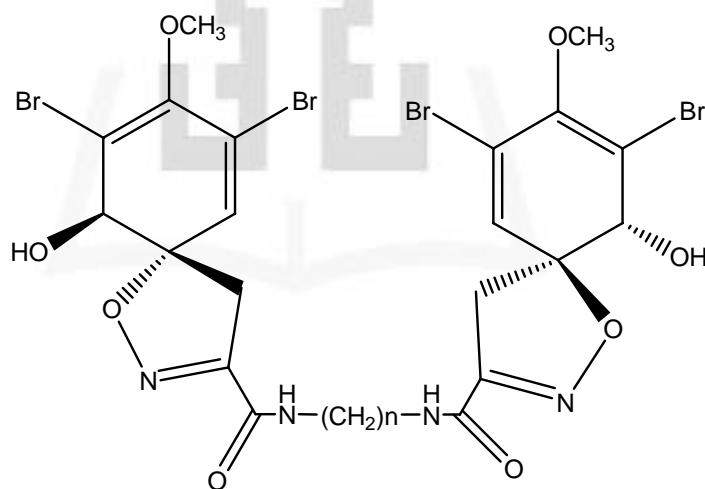
71



72

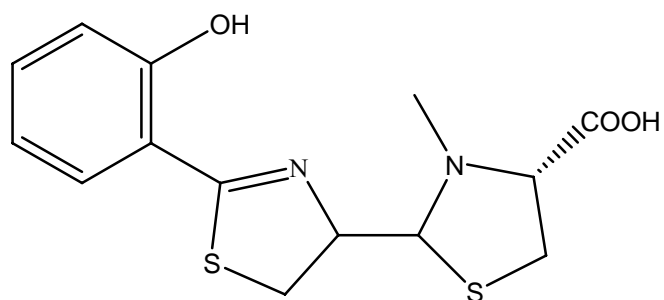


73



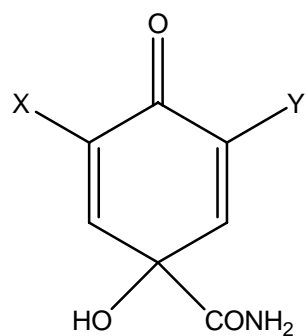
n=4, **74**

n=5, **75**

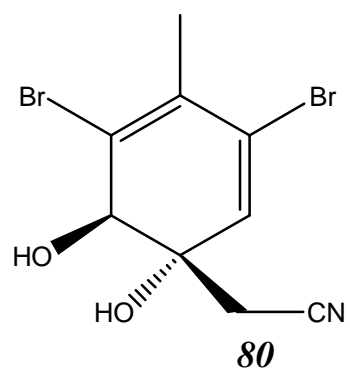


76

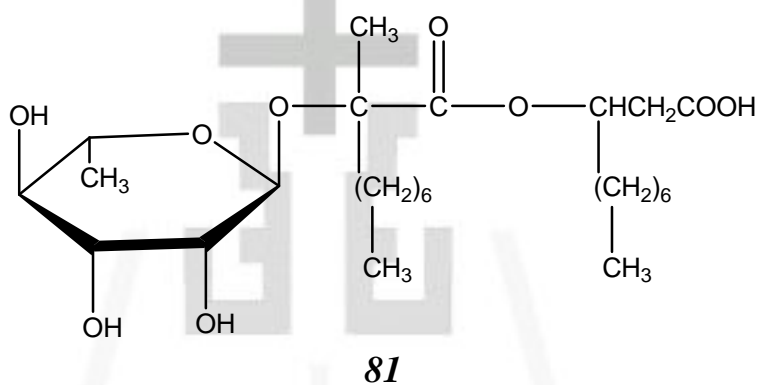
Halide analog



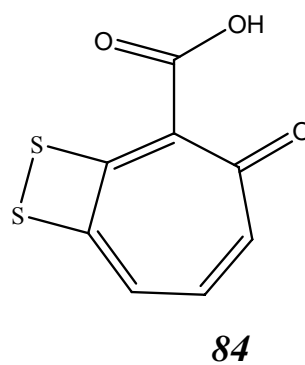
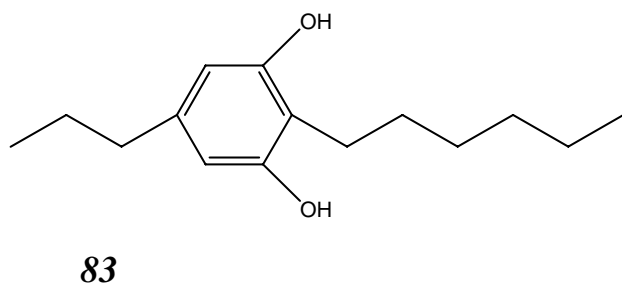
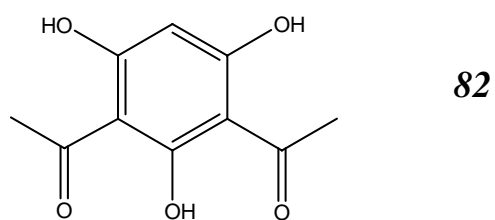
- X=Y=Br **77**
X=Br, Y=Cl **78**
X=Y=Cl **79**



Glucoside analog



Benzenoid derivatives



貳、實驗結果與討論

海洋菌株 #M1B、#MO6、#AW52 之培養液經由乙酸乙酯的分配萃取後，自 #M1B 中分離出七個化合物，分別為 2-*n*-heptylquinol-4-one (1)、2-aminophenyl acetate (2)、cyclo-L-Pro-L-Phe (3)、cyclo-L-Tyr-L-Pro (4)、hydroxyphenazine (5)、phenazine-1-carboxamide (6) 和 2-heptylquinolin-4-ol (11)；自 #MO6 中分離得到四個化合物，分別為 *N*-(2'-Phenylethyl)isobutyramide (7)、2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide (8)、2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide (9)、*N*-(2'-phenylethyl)isovaleramide (10)；自 #AW52 中分離得到三個化合物，分別為 cyclo-L-Pro-L-Leu (12)、cyclo-L-Pro-L-Val (13)、cyclo-L-Pro-L-Ile (14) 和 cyclo-L-Pro-L-Met sulfoxide (15)。以上各株萃取物之分離、純化流程，分別如圖 1、2、3 所示。

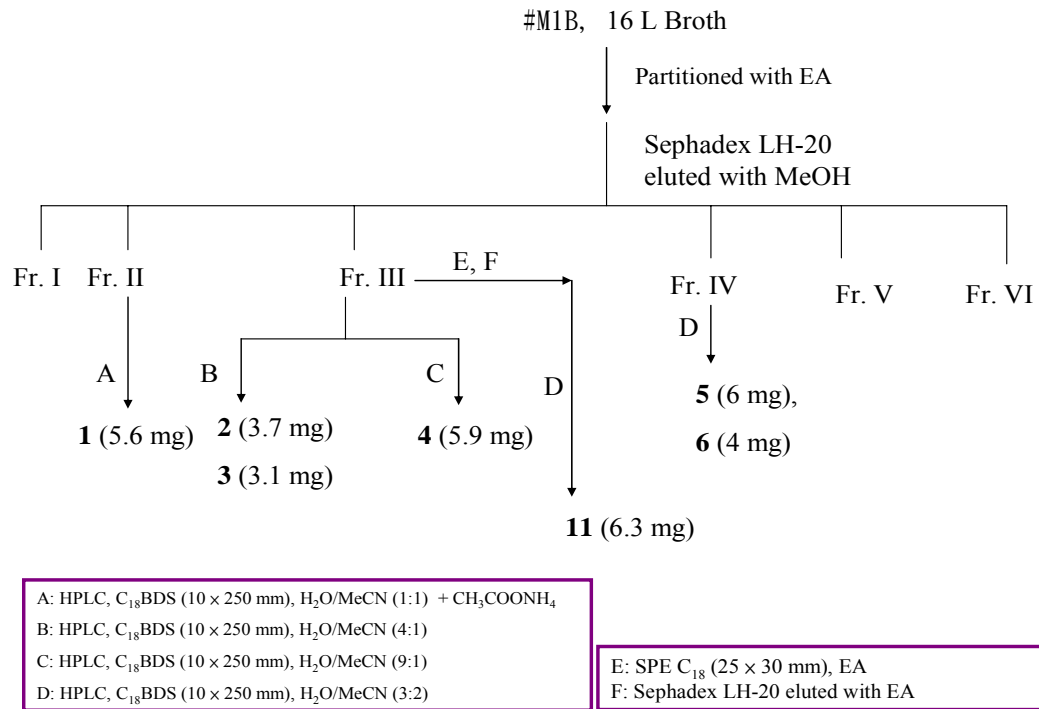
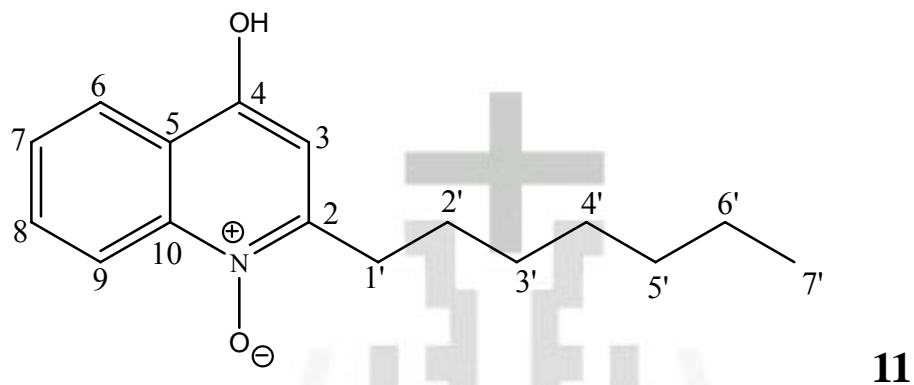
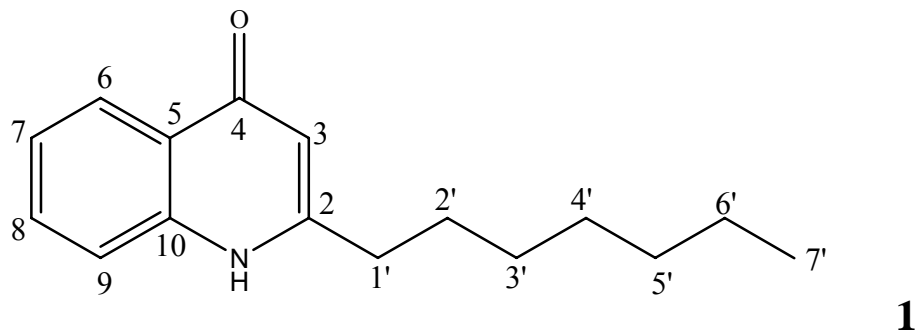


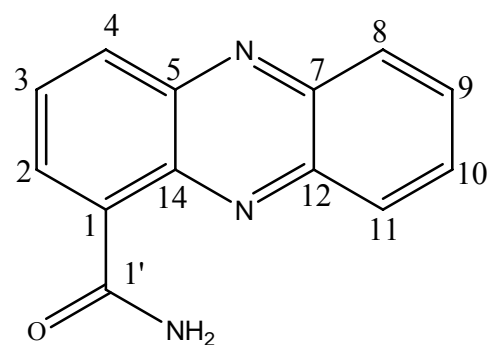
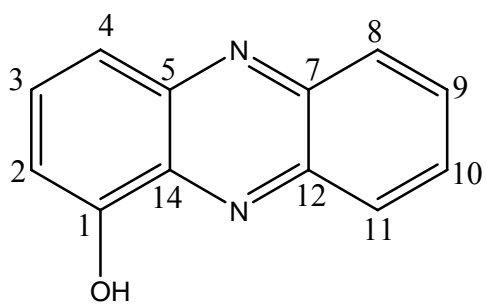
圖 1、#M1B 菌株培養液之乙酸乙酯萃取物分離流程

化合物 1-15，依其骨架的相似性可分為以下五類：

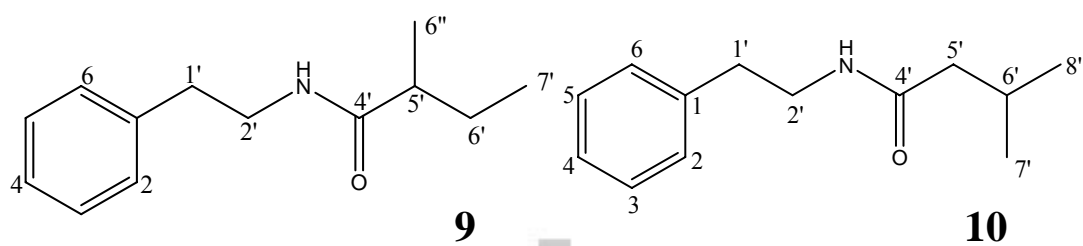
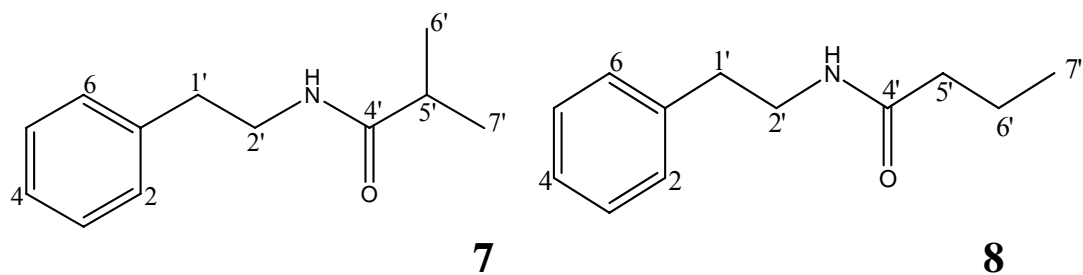
Quinoline alkaloids 喹林生物鹼



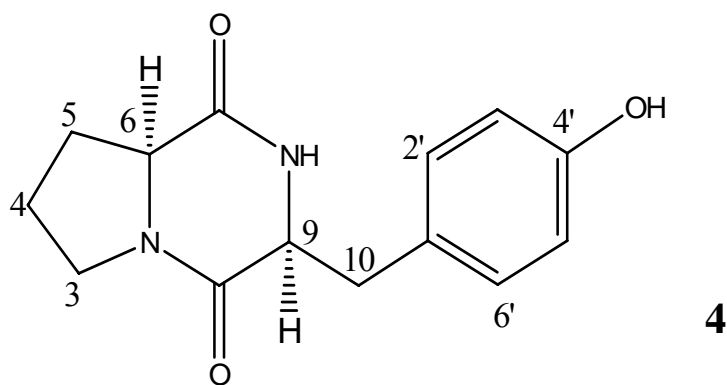
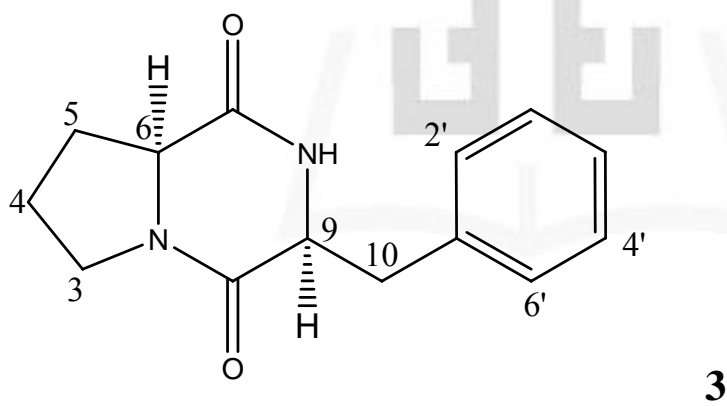
Phenazine alkaloids 吩嗪生物鹼

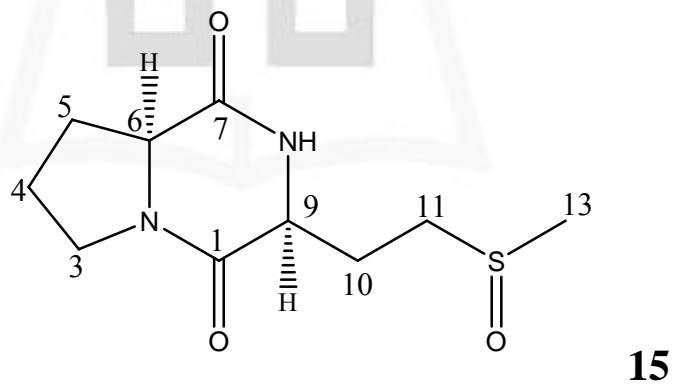
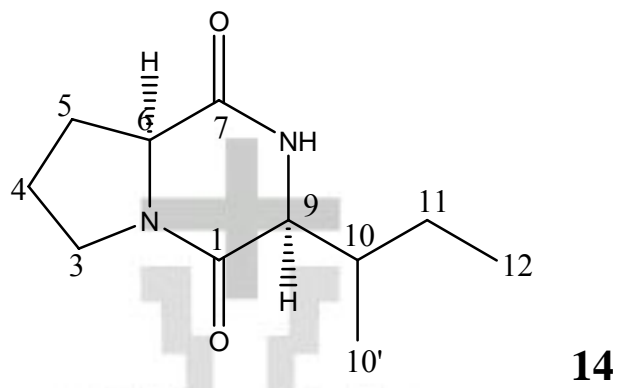
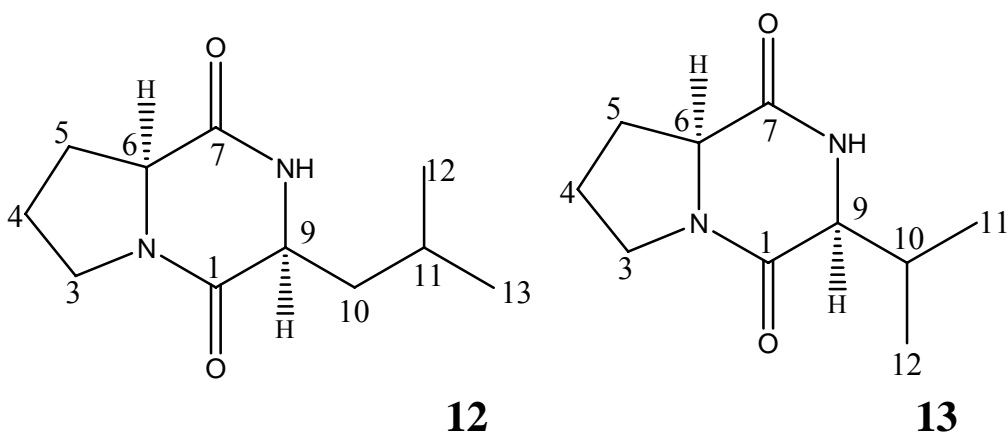


Phenylamides derivatives 芳香胺衍生物

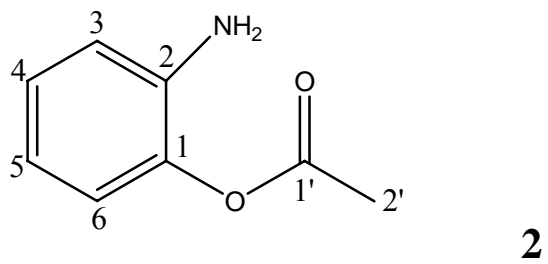


Diketopiperazines 環狀雙胺基酸

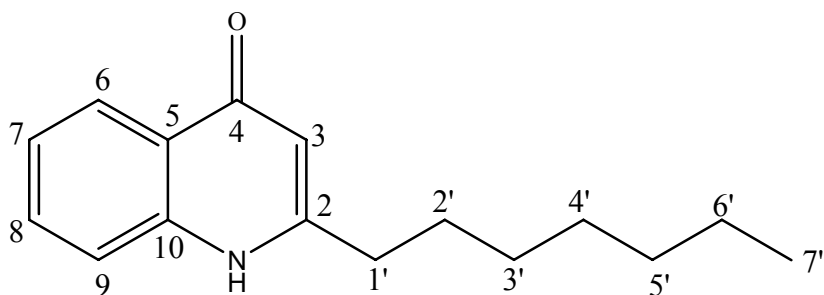




其他



2.1.1 2-*n*-heptylquinol-4-one (**1**) 之結構解析



化合物 **1** 為棕色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +12.1^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 245 (圖 4)。由紅外光譜顯示有胺基 (3297 cm^{-1})、共軛羰基 (1637 cm^{-1}) 和苯環 ($1594, 1506\text{ cm}^{-1}$) 等官能基的存在 (圖 5)，紫外光譜在 234、315 和 327 nm 有最大吸收 (圖 6)。

化合物 **1** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) 顯示在芳香區中 (圖 7)，有 δ_{H} 7.37 (1H, dd, $J = 7.2, 7.4\text{ Hz}$, H-7)、7.60 (1H, brd, $J = 7.2\text{ Hz}$, H-8)、7.58 (1H, brs, H-9)、8.19 (1H, d, $J = 7.4\text{ Hz}$, H-6) 等四組訊號，推測是一個鄰位雙取代的苯環；一組三取代雙鍵的質子訊號位於 δ_{H} 6.21 (1H, s, H-3)；一組三重峰訊號位於 δ_{H} 0.86 (3H, t, H-7')，推測為一末端甲基；在 δ_{H} 1.25~1.38 (8H, m, H-3' ~ 6') 有 8 個氫的吸收訊號；同時在較低場域有 δ_{H} 1.73 (2H, m, H-2') 及 2.69 (2H, t, H-1') 的訊號吸收，藉由 COSY 實驗 (圖 9) 得知 H-1' ~ H-7' 間互有相關，為一長脂肪鏈。由碳譜 (圖 8) 得知 δ_{C} 180.6 (C-4) 為一個共軛羰基訊號，且由 HMBC 實驗得知 (圖 10)， δ_{H} 6.21 (H-3) 和 δ_{C} 35.0 (C-1')、 δ_{C} 157.2 (C-2)、 δ_{C} 180.0 (C-4) 及 δ_{C} 126.0 (C-5) 有相關，得知 δ_{C} 108.8 (C-3) 和 δ_{C} 157.2 (C-2) 的兩個訊號，為與羰基共軛的一組雙鍵。另外， δ_{H} 2.69 (H-1') 和 δ_{C} 157.1

(C-2)、 δ_C 108.8 (C-3) 及 δ_C 32.8 (C-2') 相關，說明了在 C-2 處與 C-1' 的長脂肪側鏈 (aliphatic chain) 做連結；此外在低場域出現的 δ_C 157.2 (C-2) 和 δ_C 141.6 (C-10) 兩個訊號，推測應接有異原子，根據 ESI-MS 所測得之分子量為奇數，推測化合物 **1** 應含有一個氮原子，因而推斷 C-2 與 C-10 經由一個氮原子連結在一起；此外，由碳譜得知， δ_C 119.1 (C-9)、125.0 (C-7)、125.5 (C-6)、126.0 (C-5)、133.4 (C-8) 和 146.1 (C-10) 為一組苯環的訊號，且 HMBC 實驗確認 δ_H 8.19 (H-6) 與 δ_C 180.0 (C-4)、 δ_C 133.4 (C-8) 及 δ_C 141.6 (C-10)， δ_H 7.37 (H-7) 與 δ_C 180.0 (C-6) 及 δ_C 119.1 (C-9)， δ_H 7.60 (H-8) 與 δ_C 180.0 (C-6) 及 δ_C 141.6 (C-10) 有相關，確定苯環上碳的排列位置。綜合以上解析所得之數據詳列於表 3，並與文獻比對後確認化合物 **1** 為已知物 2-*n*-heptylquinol-4-one⁵³。

表 3、¹H- and ¹³C-NMR data of **1** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H	HMBC (H→C)
2	157.2		
3	108.8	6.21 (1H, s)	1', 2, 4, 5
4	180.0		
5	126.0		
6	125.5	8.19 (1H, d, <i>J</i> = 7.4 Hz)	4, 8, 10
7	125.0	7.37 (1H, dd, <i>J</i> = 7.2, 7.4 Hz)	6, 9
8	133.4	7.60 (1H, brd, <i>J</i> = 7.2 Hz)	6, 10
9	119.1	7.58 (1H, brs)	
10	141.6		
1'	35.0	2.69 (2H, m)	2, 3, 2'
2'	32.8	1.73 (2H, m)	1', 3', 4'
3'	30.2	1.25~1.38 (2H, m)	1', 4'
4'	30.2	1.25~1.38 (2H, m)	2', 5'
5'	30.1	1.25~1.38 (2H, m)	3', 6', 7'
6'	23.6	1.25~1.38 (2H, m)	4', 7'
7'	14.4	0.86 (3H, t, <i>J</i> = 6.8 Hz)	5', 6'

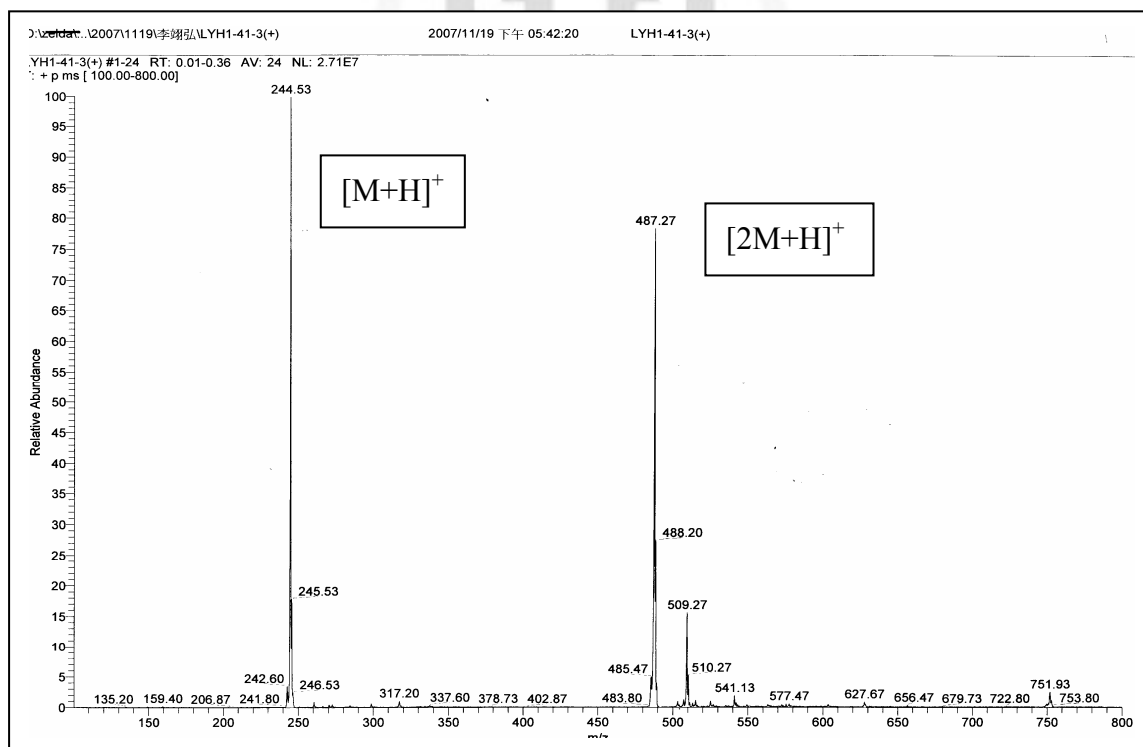


圖 4、化合物 **1** 之電噴灑電離質譜。

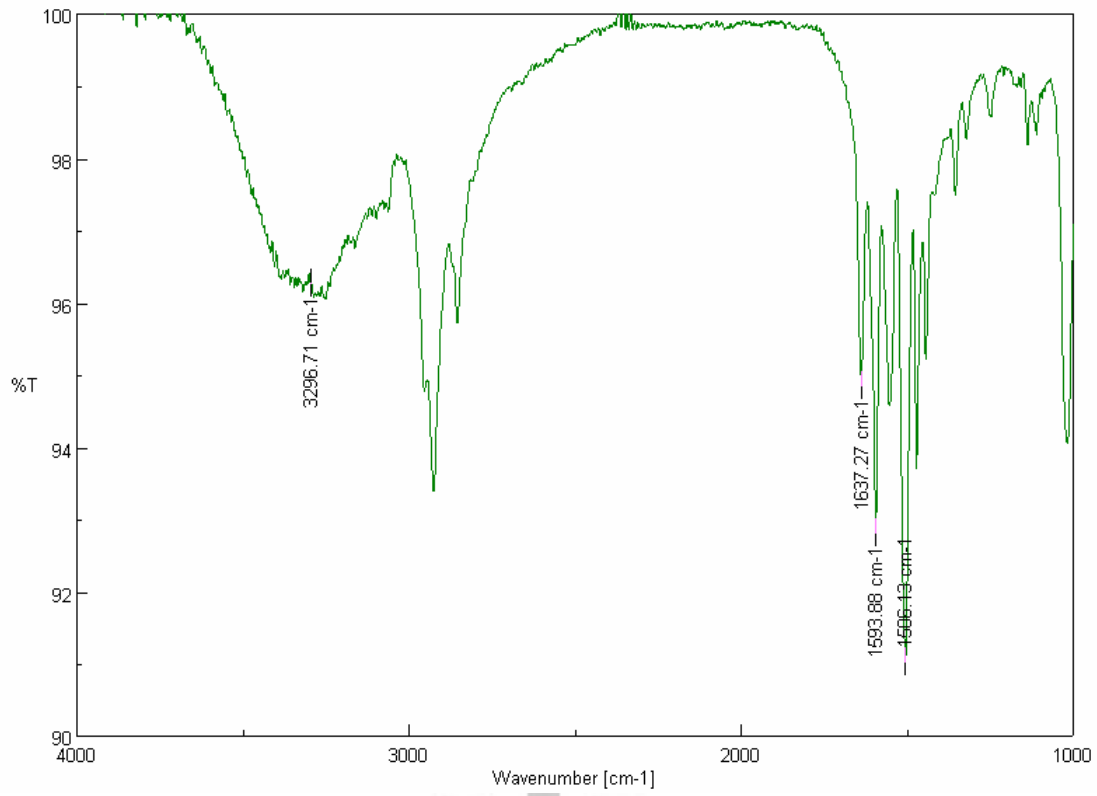


圖 5、化合物 1 之紅外光譜。

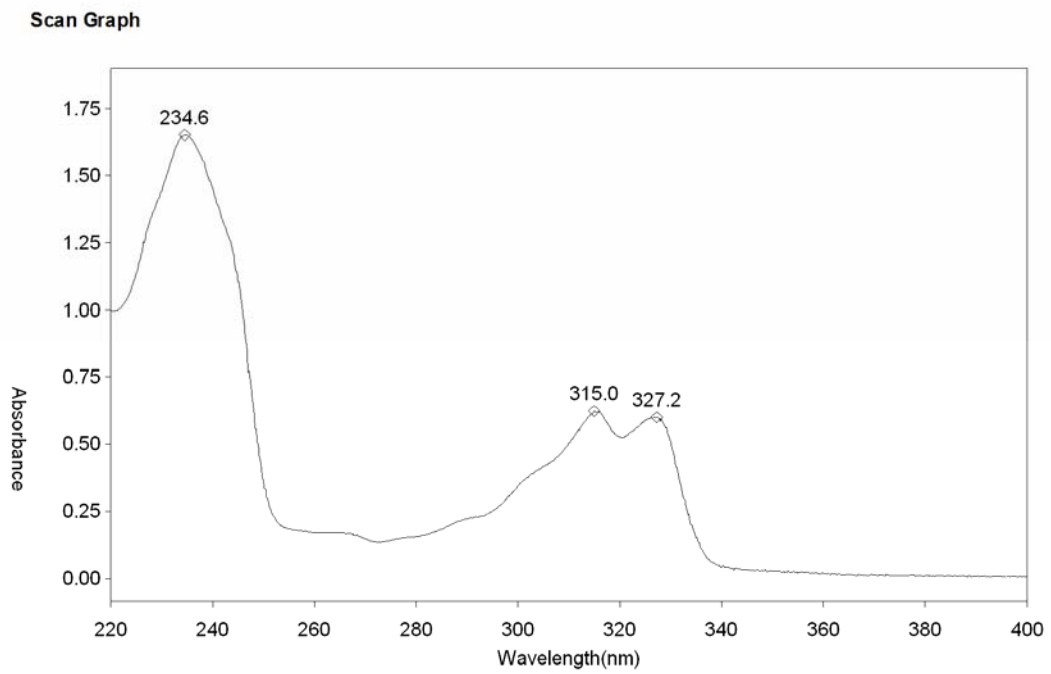


圖 6、化合物 1 之紫外光譜。

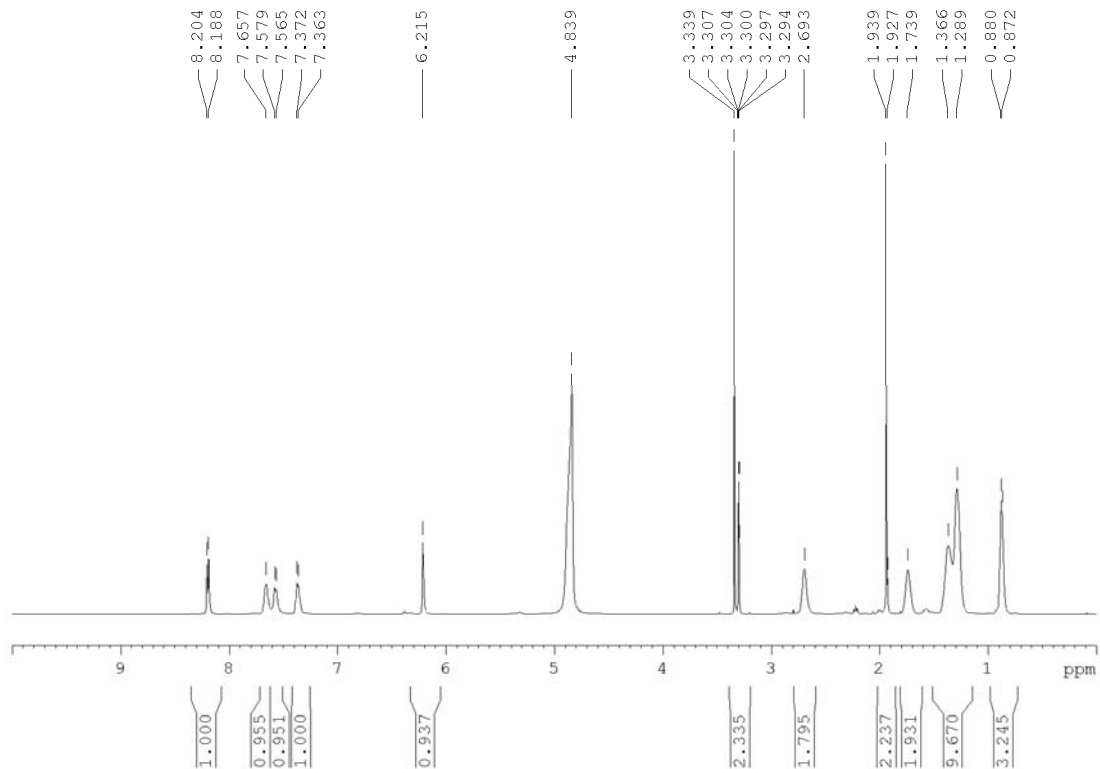


圖 7、化合物 1 之氫譜。

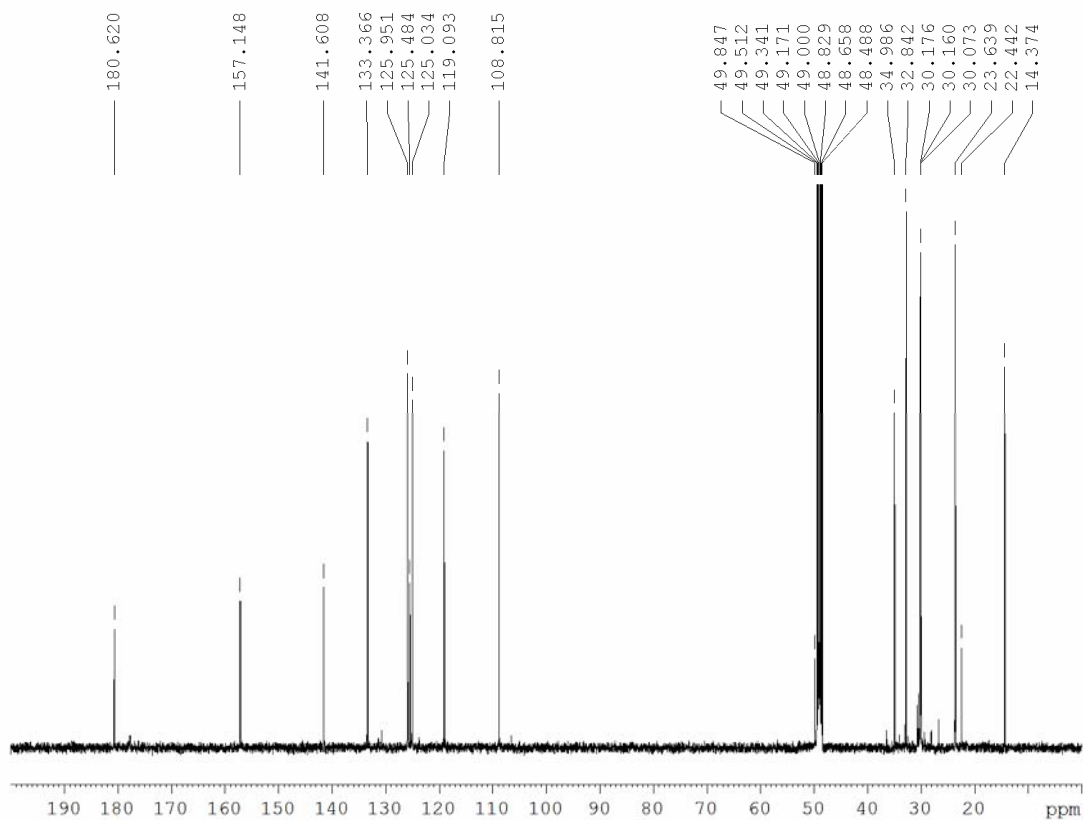


圖 8、化合物 1 之碳譜。

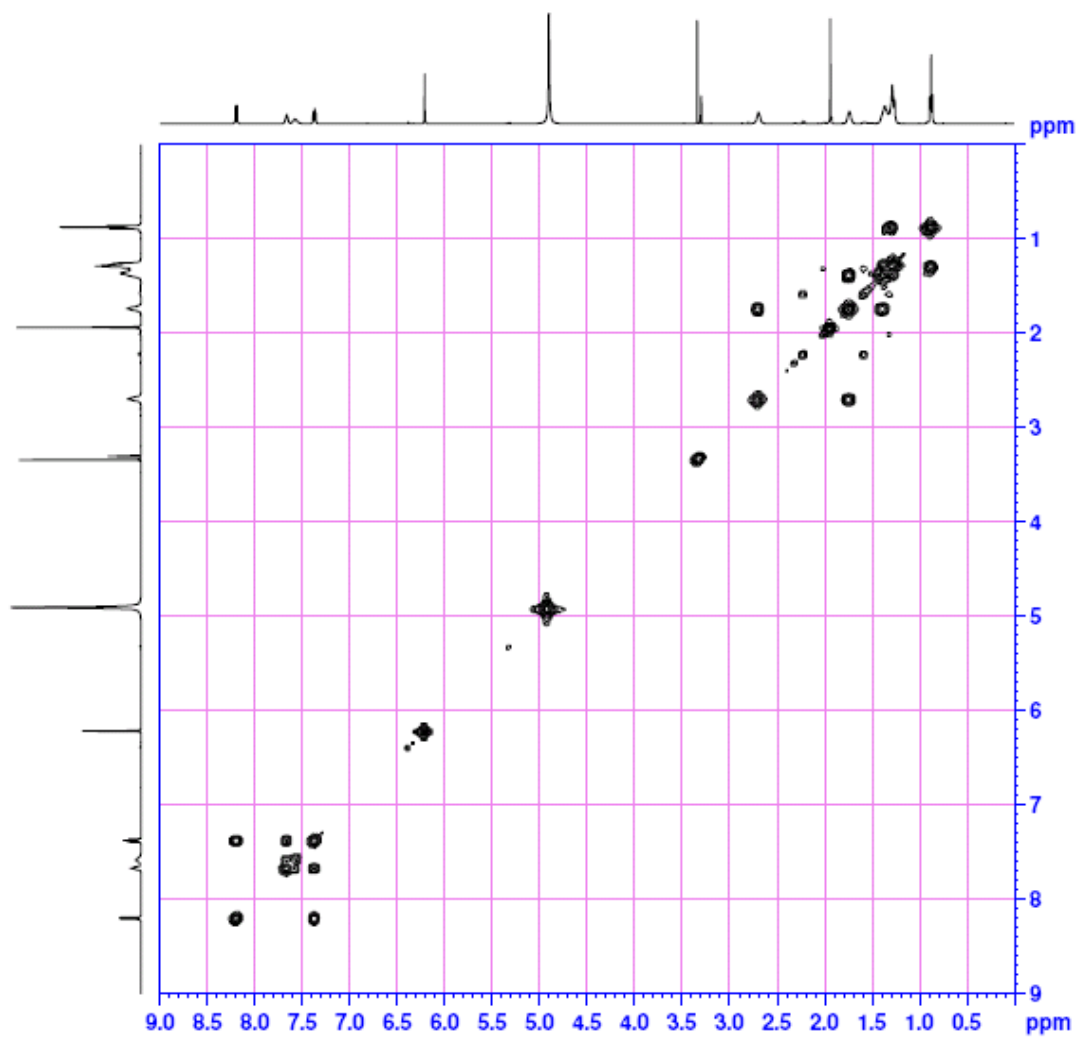
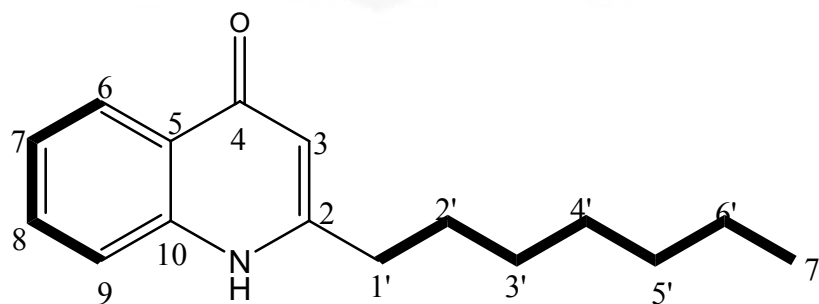


圖 9、化合物 1 之 COSY 圖譜。



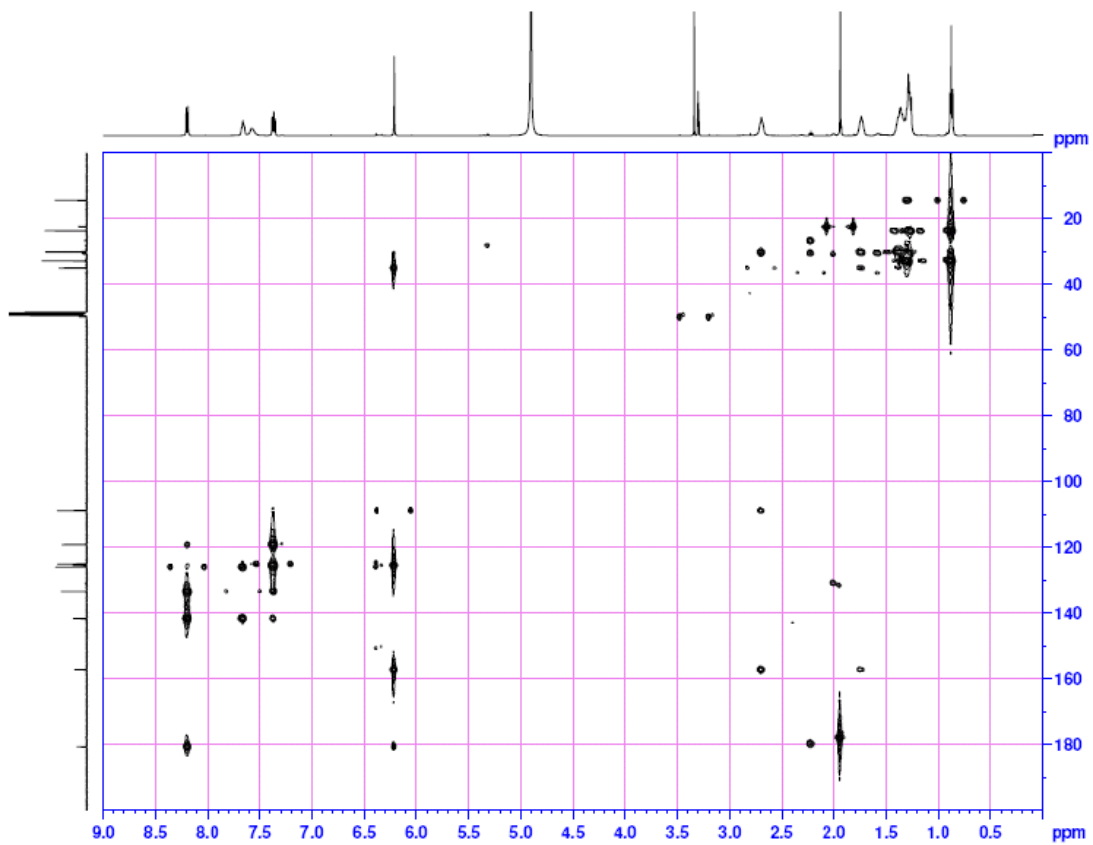
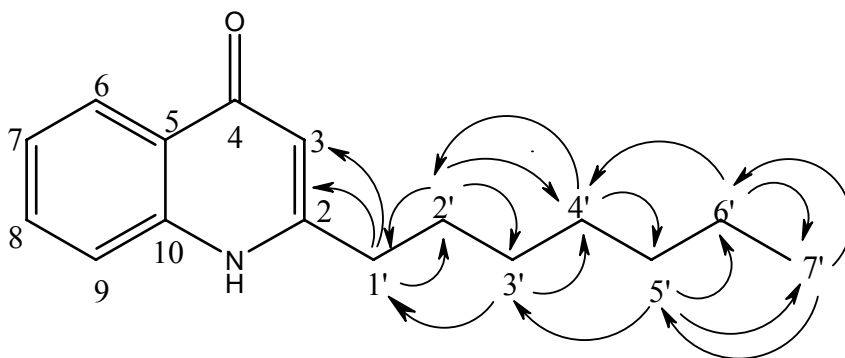
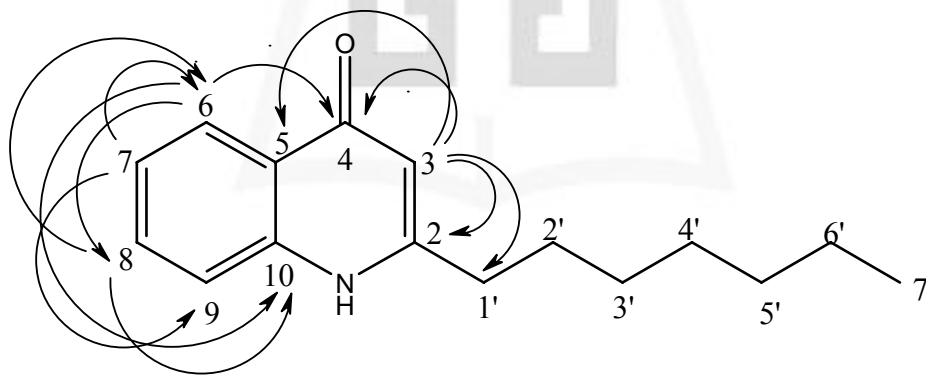
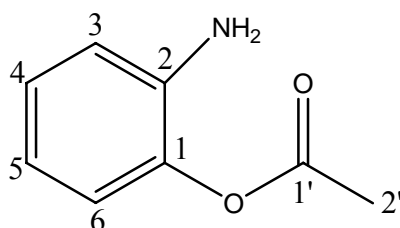


圖 10、化合物 1 之 HMBC 圖譜



2.1.2 2-aminophenyl acetate (**2**) 之結構解析



化合物 **2** 為黃色油狀液體，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +2.4^\circ$ (c 0.50, MeOH)，由 HRESI 實驗 (圖 11) 得到 $[M+H]^+$ ，其分子量應為 152.07，輔以 HRESI 實驗推測此化合物的分子量為 $C_8H_9NO_2$ ，推測化合物 **2** 應含有一個氮原子。紅外光譜顯示有胺基 (3404 cm^{-1})、苯環 (1527 cm^{-1}) 和與胺基形成氫鍵的酯基 (1664 cm^{-1}) 等官能基存在 (圖 12)。紫外光譜在 238、241 和 282 nm 有最大吸收 (圖 13)。

在化合物 **2** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) 在芳香區中 (圖 14)，顯示 δ_H 7.59 (1H, d, $J = 0.8\text{ Hz}$, H-6)、6.98 (1H, dd, $J = 7.5, 0.8\text{ Hz}$, H-5)、6.83 (1H, d, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-3) 及 6.78 (1H, dd, $J = 7.5, 0.8\text{ Hz}$, H-4)，所以推測是一個鄰位雙取代的苯環。由碳譜 (CD_3OD , 125 MHz) 得知 (圖 15)，在 δ_C 172 (C-1') 有吸收，有一個羰基存在，且有一組的甲基訊號在 δ_H 2.19 (3H, s, H-2') 有吸收，所以得知側鏈是乙酯基；在苯環中有出現一個 δ_C 149.8 (C-1) 的訊號，推測有一個接氧原子的四級碳，所以側鏈乙酯基在此與苯環連接，而另一個四級碳 δ_C 127.1 (C-2)，則與胺基相接。綜合以上數據解析得到之數據詳列於表 4，得知化合物 **2** 為 2-aminophenyl acetate。經由文獻比對後，發現化合物 **2** 為首次在天然物發現的，而在 1904 年首次有人發表合成此化合

物⁴⁹，由 *o*-Amino phenyl methyl carbonates (C₆H₄ (OCO₂CH₃)(NH₃Cl))，經
 氯化氫 (HCl) 還原後，生成此化合物。

表 4、¹H- and ¹³C-NMR data of **2** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

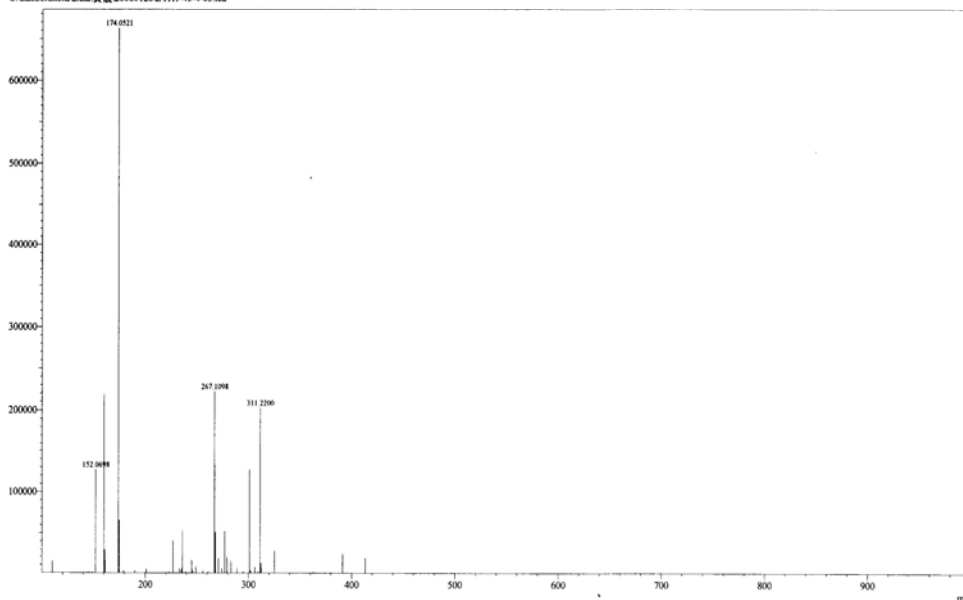
No.	¹³ C	¹ H
1	149.8	
2	127.1	
3	117.3	6.83 (1H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz)
4	124.0	6.78 (1H, dd, <i>J</i> = 7.5, 0.8 Hz)
5	126.8	6.98 (1H, dd, <i>J</i> = 7.5, 0.8 Hz)
6	120.6	7.59 (1H, d, <i>J</i> = 0.8 Hz)
1'	172.2	
2'	23.4	2.19 (3H, s)

2008/1/31 15:01:37 1 / 1

貴重儀器使用中心 高解析質譜儀HRESI
 ==== Shimadzu LCMS ITTOF ====

<Spectrum>

PosESI
 ScanNo:117(103-131) BaseMass:174.051 Inr:663446
 C:\LabSolutions\Data\20080128\LYHI-45-4-05.lcd



C:\LabSolutions\Data\20080128\LYHI-45-4-05.lcd

圖 11、化合物 **2** 之電噴灑電離質譜。

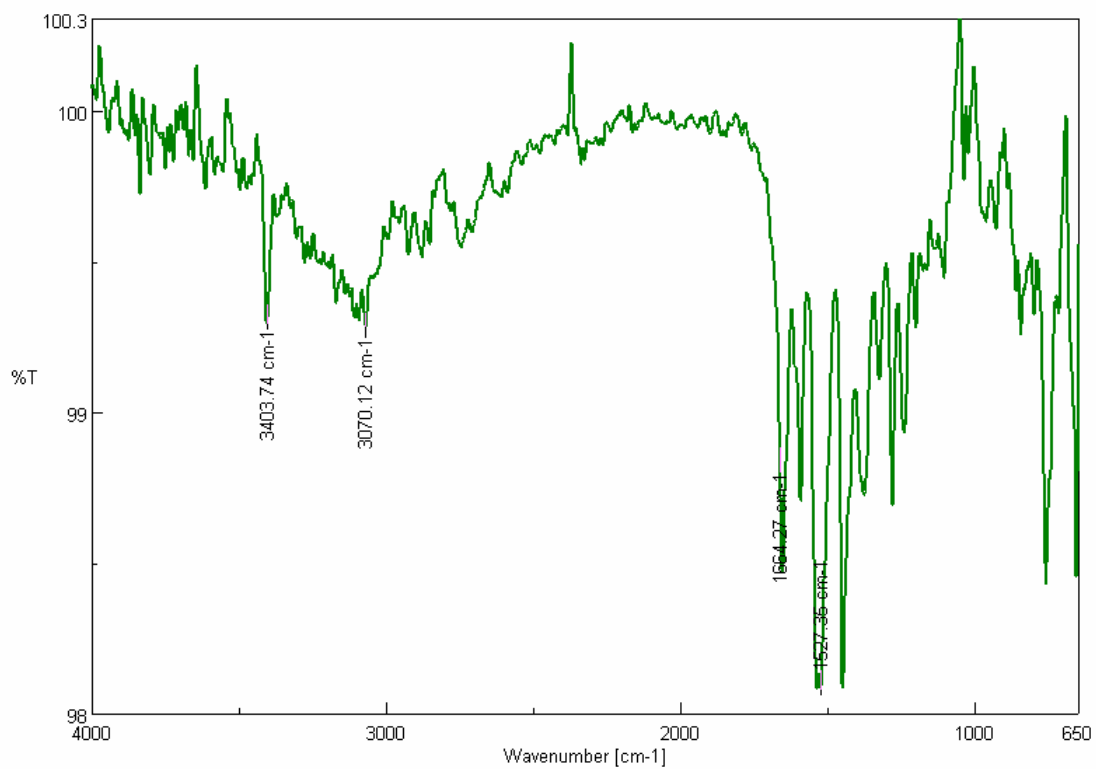


圖 12、化合物 2 之紅外光譜。

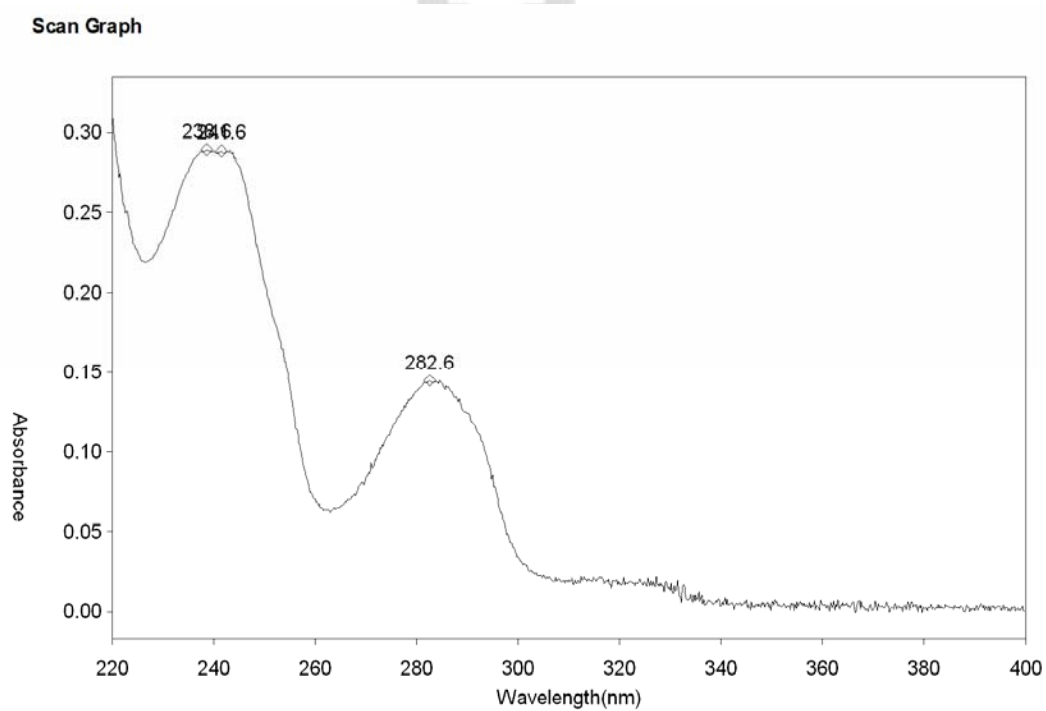


圖 13、化合物 2 之紫外光譜。

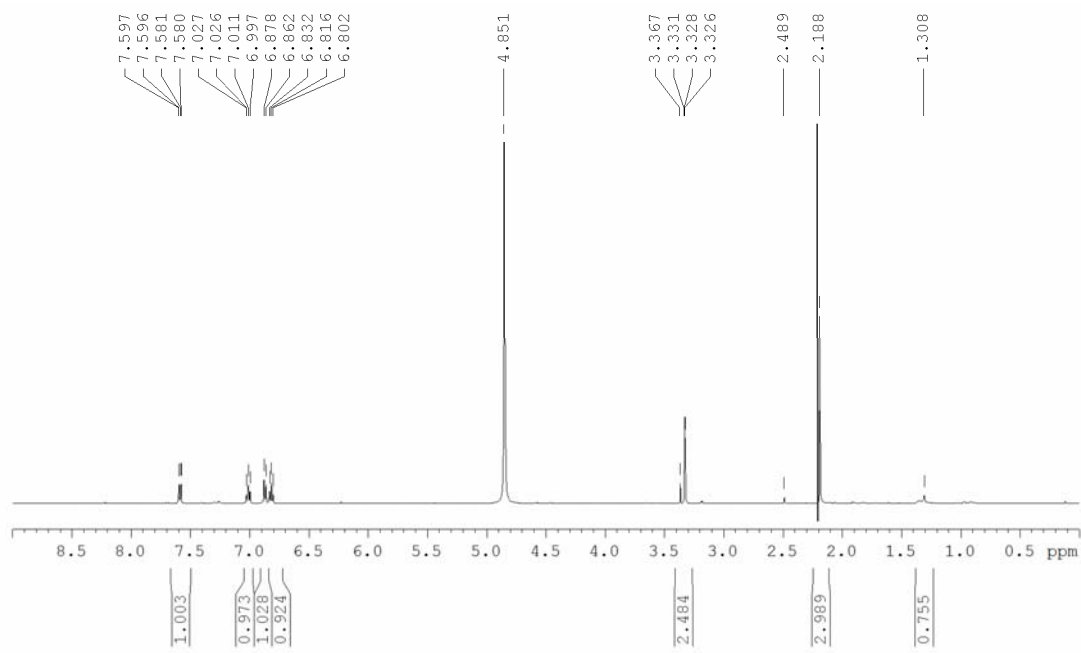


圖 14、化合物 2 之氫譜。

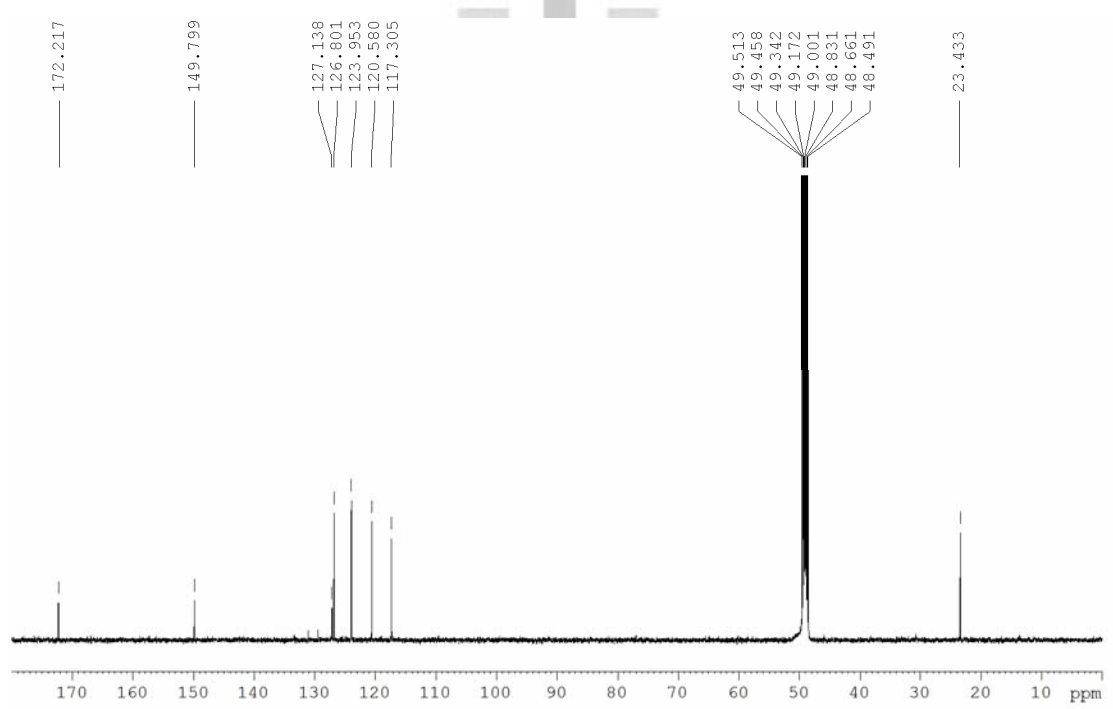
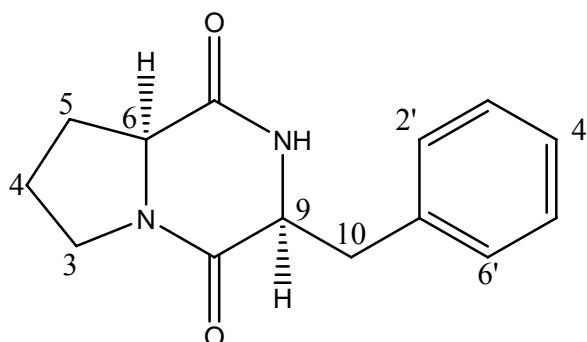


圖 15、化合物 2 之碳譜。

2.1.3 cyclo-_L-Pro-_L-Phe (3) 之結構解析



化合物 **3** 為白色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} -52.4^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 245 (圖 16)。紅外光譜顯示有胺基 (3236 cm^{-1})、醯胺羰基 (1658 cm^{-1}) 和苯環 (1504 cm^{-1}) 等官能基 (圖 17)。紫外光譜在 258 nm 有最大吸收 (圖 18)。

化合物 **3** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz)，在芳香區中 (圖 19) 顯示有一組 5 個質子的吸收訊號在 $\delta_{\text{H}} 7.20 \sim 7.29$ (5H, m) 出現，推測為一個單取代的苯環。兩個接有異原子的次甲基訊號在 $\delta_{\text{H}} 4.06$ (1H, dd, $J = 2.2, 5.0\text{ Hz}$ H-6)、 4.43 (1H, t, $J = 5.0\text{ Hz}$, H-9) 出現，以及四個亞甲基訊號在 $\delta_{\text{H}} 1.79$ (H_2 -4)、 $\delta_{\text{H}} 1.25$ (1H, d, $J = 2.2\text{ Hz}$, H_a -5) 及 2.08 (1H, t, $J = 5.0\text{ Hz}$, H_b -5)、 $\delta_{\text{H}} 3.16$ (2H, d, $J = 5.0\text{ Hz}$, H_2 -10) 和 $\delta_{\text{H}} 3.37$ 及 3.53 (each 1H, m, H_2 -3)。由碳譜 (圖 20) 得知有兩個羰基分別位於 $\delta_{\text{C}} 167.4$ (C-1) 和 171.3 (C-7)，同時在 $\delta_{\text{C}} 136.7$ (C-1')、 131.3 (C-2')、 129.6 (C-3')、 128.5 (C-4')、 129.6 (C-5') 和 131.3 (C-6') 發現一組屬於苯環的訊號，以及 3 個位於 $\delta_{\text{C}} 46.1$ (C-3)、 59.1 (C-9) 和 59.7 (C-6) 的訊號。由 COSY 實驗 (圖 21) 得知 $\delta_{\text{H}} 3.37$ 和 3.53 (each 1H, m, H_2 -3) 與 $\delta_{\text{H}} 1.79$

(H₂-4) 相關，而 δ_{H} 1.79 (H₂-4) 與 δ_{H} 1.25 和 2.08 (each 1H, m, H₂-5) 相關，且與 δ_{H} 4.05 (H-6) 也有相關。 δ_{H} 4.43 (H-9) 與 δ_{H} 3.16 (H₂-10) 互有相關，以及由 HMBC 實驗 (圖 22) 得知 δ_{H} 3.16 (H₂-10) 與 δ_{C} 167.4 (C-1)、 δ_{C} 131.3 (C-2') 有相關，可以推測得知 (H₂-10) 連接在一單取代苯環。在較低場域出現 δ_{H} 3.37 及 3.53 (H₂-3) 的訊號並與 δ_{C} 167.4 (C-1) 相關，故推測 δ_{C} 45.9 (C-3) 與 δ_{C} 167.4 (C-1) 之間有異原子存在，比對 ESI/MS 實驗所得之結果，推測此異原子為氮；此外， δ_{H} 4.43 (H₂-9) 與 δ_{C} 171.3 (C-7) 相關，比對 ESI/MS 實驗結果，可得知在 C-7 與 C-9 之間，有一氮原子存在，並由紅外光譜的結果印證此結構內含有一個醯胺基。進一步與文獻比對後，推測其結構應為 cyclo-Pro-Phe。此結構具有兩個立體中心，利用鹽酸水解為兩個單胺基酸，使用可分析胺基酸鏡相異構物的 HPLC 管柱，再分別與 L-Pro 和 L-Phe 兩標準品的滯留時間比對，滯留時間分別為 L-Pro (5.34 min) 及 L-Phe (41.32 min)，綜合以上數據確認結構為 cyclo- L-Pro- L-Phe^{48, 54}。

表 5、 ^1H - and ^{13}C -NMR data of **3** (CD_3OD , 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C)

No.	^{13}C	^1H	HMBC (H \rightarrow C)	COSY
1	167.4			
3	45.9	3.37 (1H, m) 3.53 (1H, m)	1, 4, 5	4
4	22.5	1.79 (2H, m)	3, 5, 6	3, 5
5	29.8	1.23 (1H, d, $J = 2.2$ Hz) 2.08 (1H, t, $J = 5.0$ Hz)	4, 6, 3	4, 6
6	59.8	4.06 (1H, dd, $J = 2.2$ Hz 5.0 Hz)	5, 7	5
7	171.3			
9	59.1	4.43 (1H, t, $J = 5.0$ Hz)	1, 7, 10, 1'	10
10	41.0	3.16 (2H, d, $J = 5.0$ Hz)	1, 9, 1', 2'	9
Ar				
1'	136.7			
2'	131.2	7.20~7.29 (1H, m)		
3'	129.6	7.20~7.29 (1H, m)		
4'	128.5	7.20~7.29 (1H, m)		
5'	129.6	7.20~7.29 (1H, m)		
6'	131.2	7.20~7.29 (1H, m)		

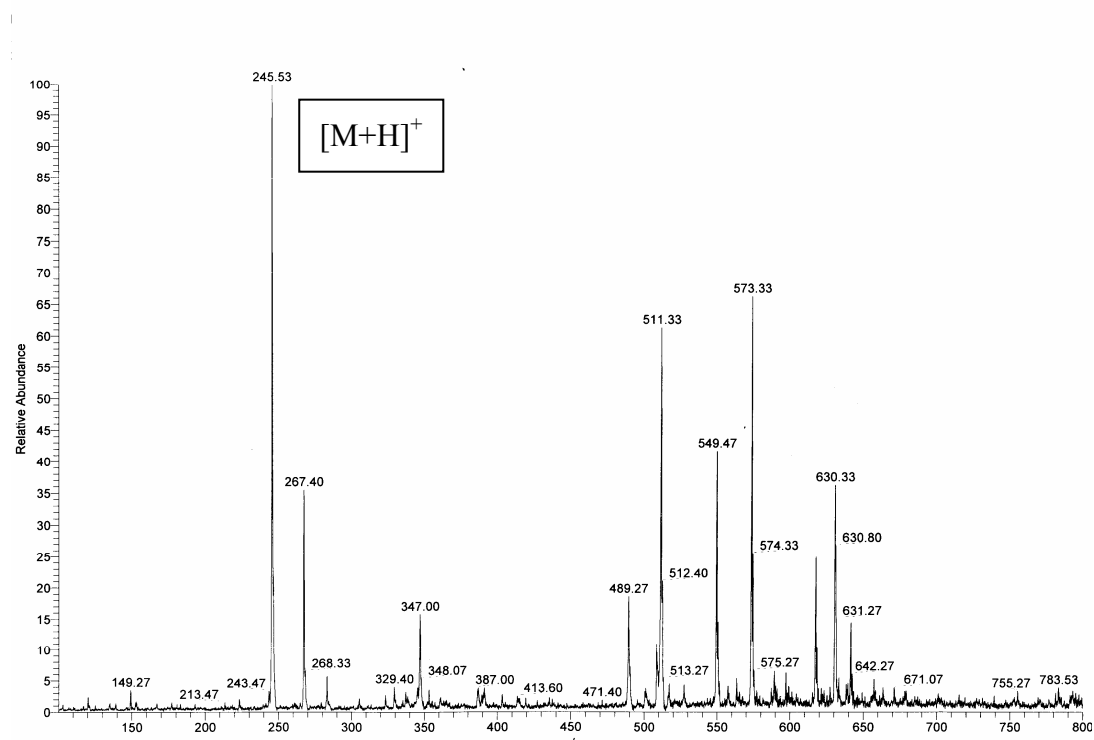


圖 16、化合物 **3** 之電噴灑電離質譜。

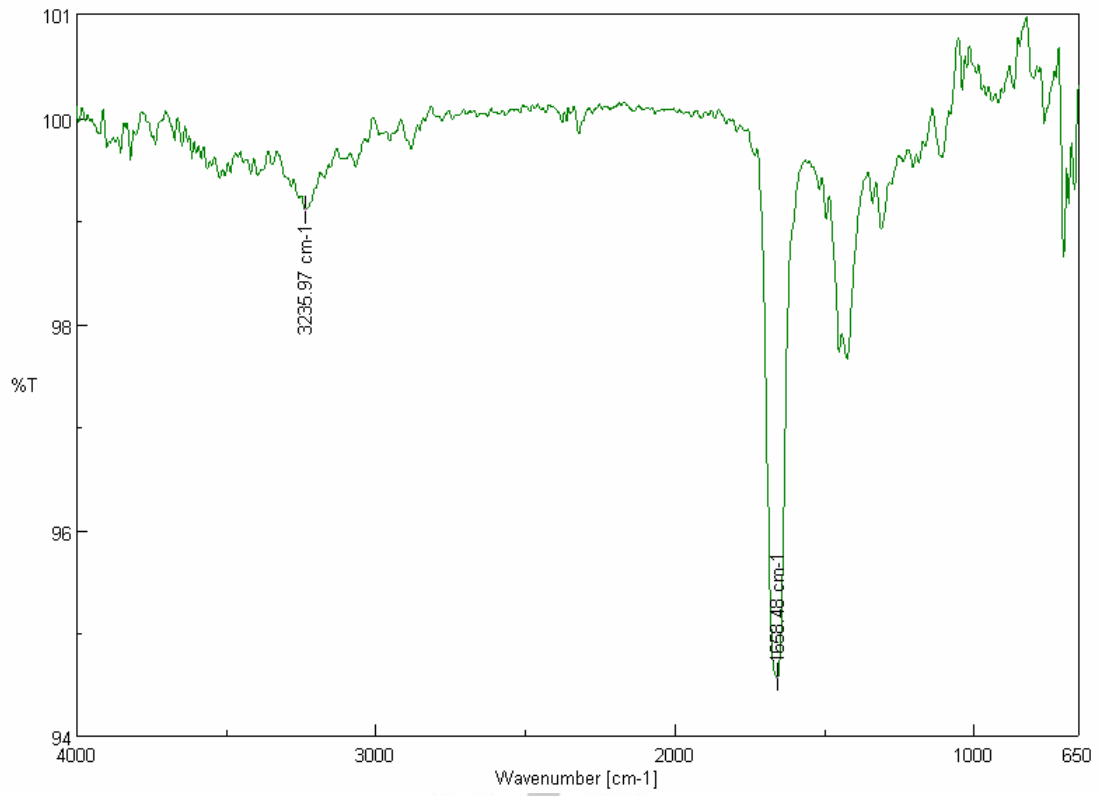


圖 17、化合物 3 之紅外光譜。

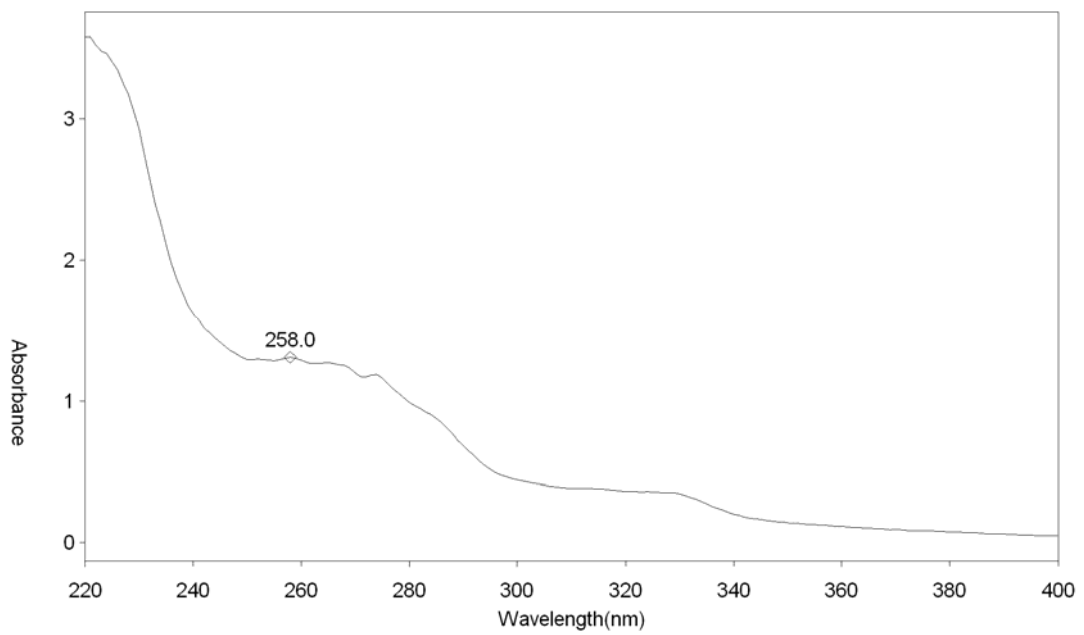


圖 18、化合物 3 之紫外光譜。

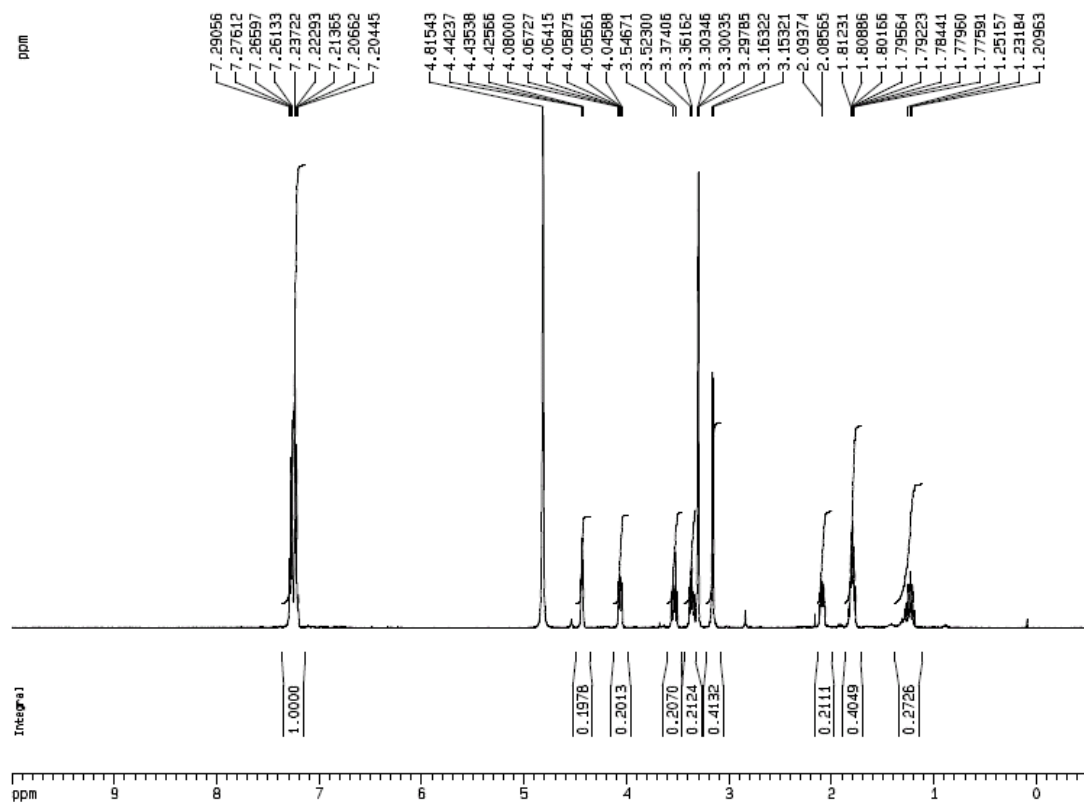


圖 19、化合物 3 之氫譜。

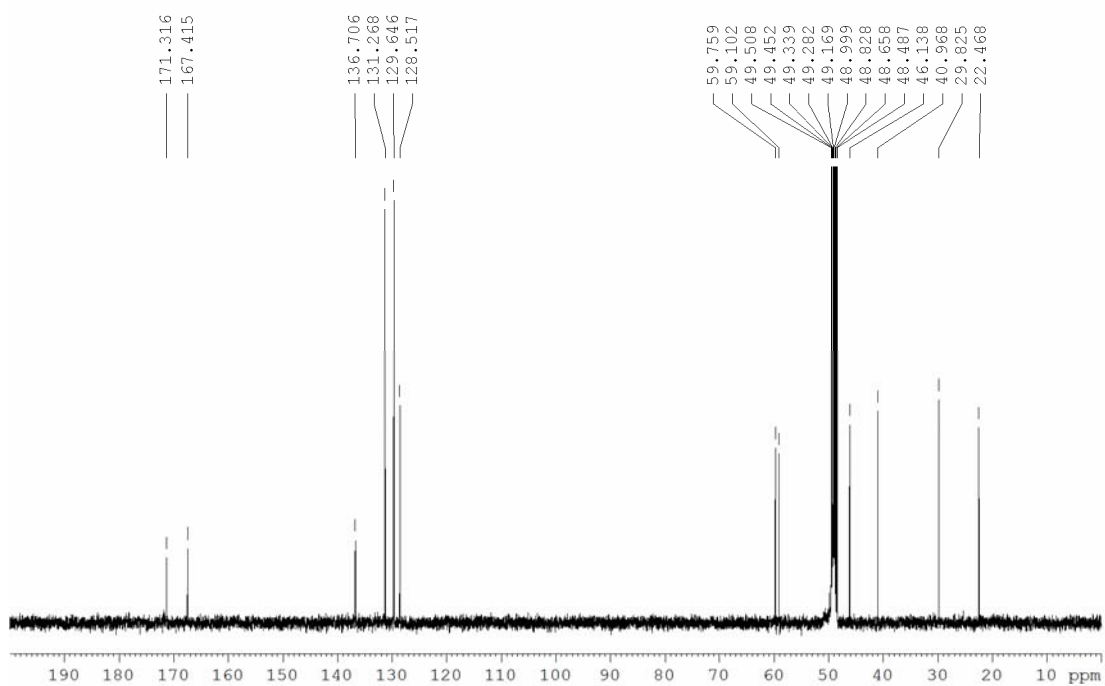


圖 20、化合物 3 之碳譜。

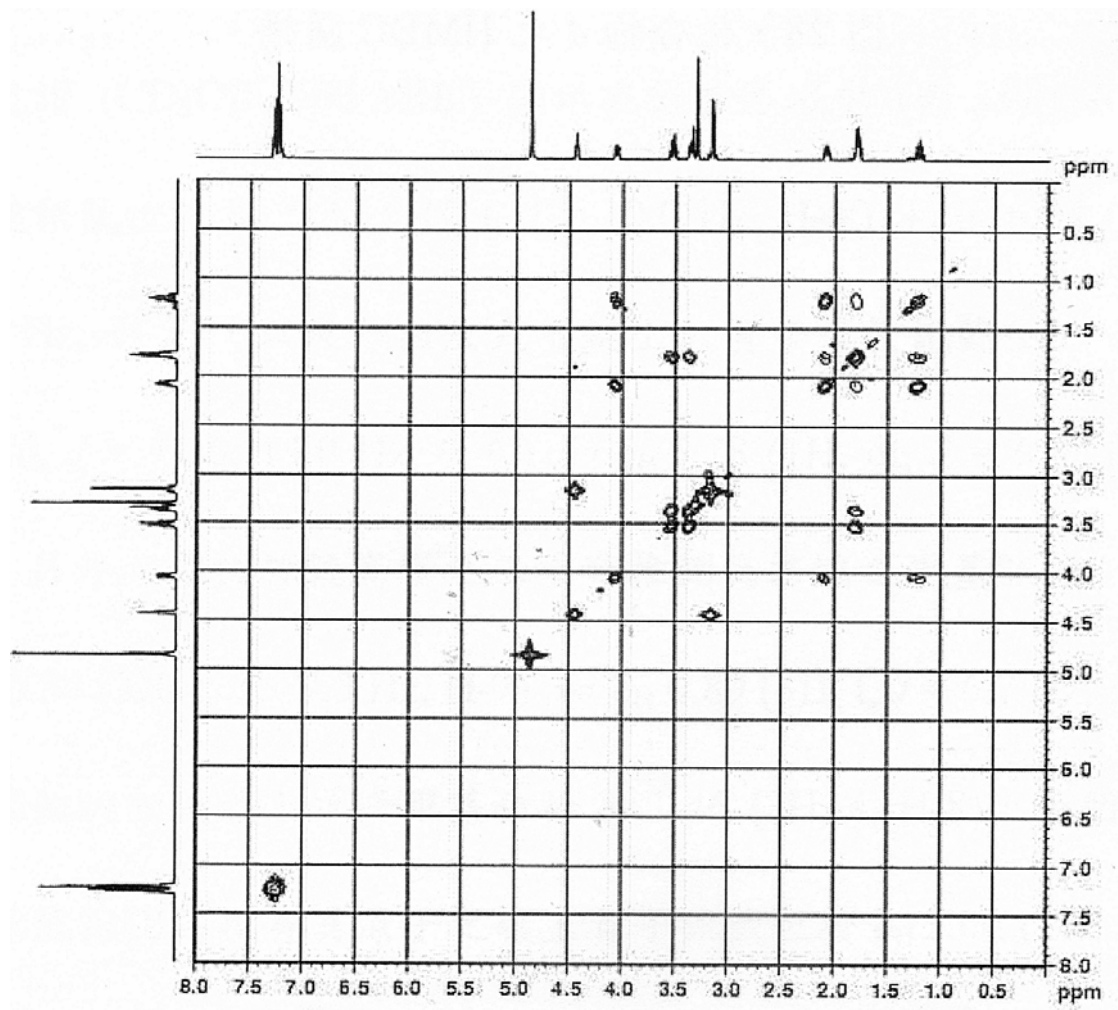
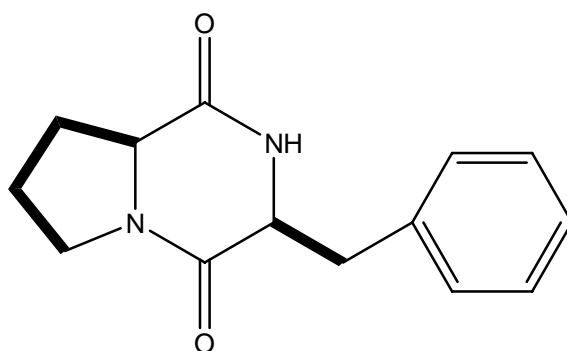


圖 21、化合物 3 之 COSY 圖譜。



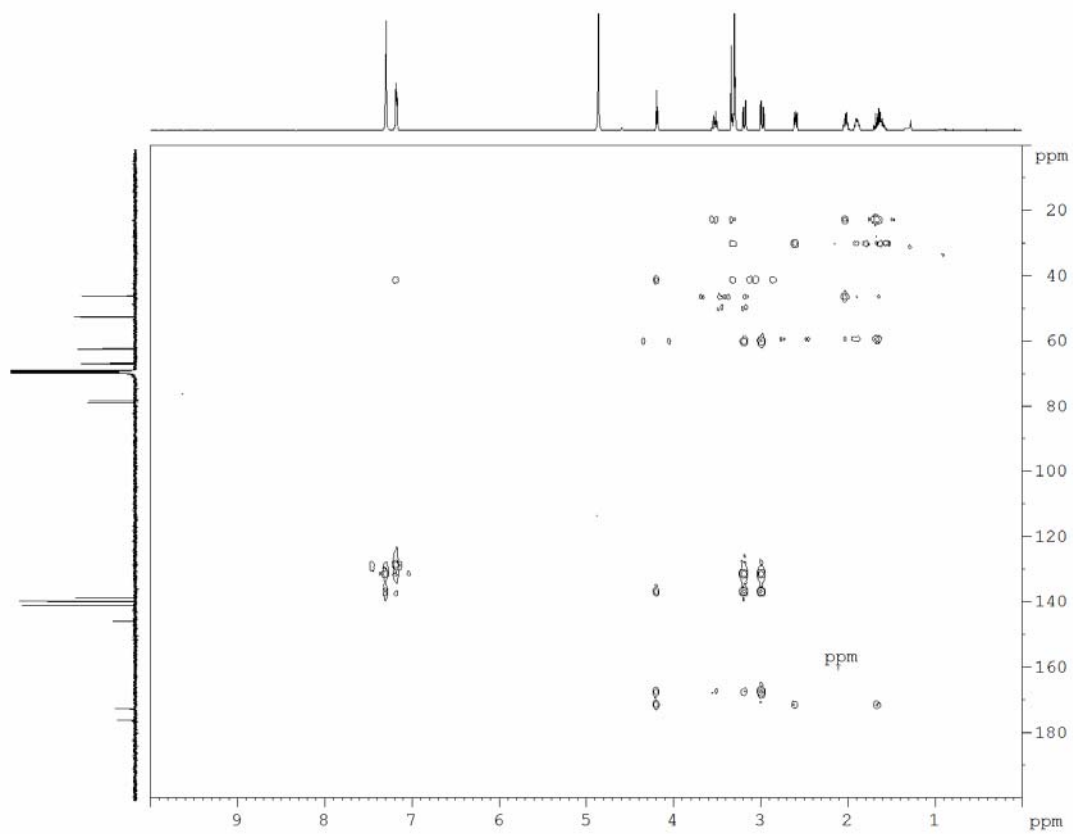
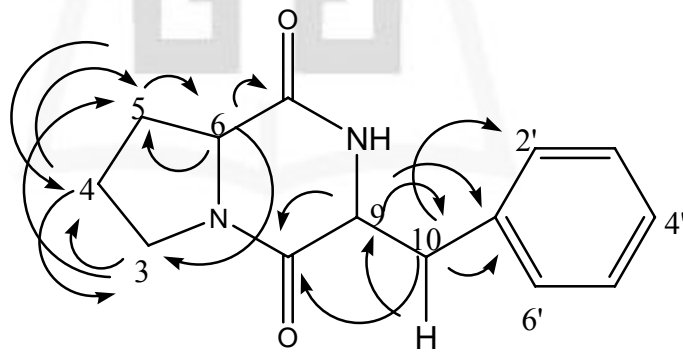
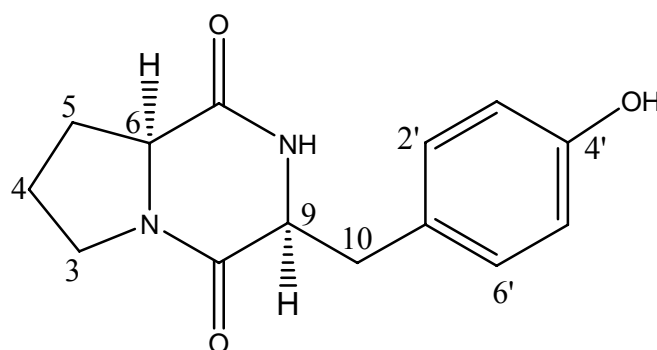


圖 22、化合物 3 之 HMBC 圖譜。



2.1.4 cyclo-L-Tyr-L-Pro (4) 之結構解析



此化合物 **4** 為白色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} -58.4^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI-MS 顯示分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 261 (圖 23)。紅外光譜顯示有羥基 (3270 cm^{-1})、苯環 (1504 cm^{-1})和醯胺羰基 (1650 cm^{-1}) 等官能基 (圖 24)。紫外光譜在 274 nm 有最大吸收 (圖 25)。

由化合物 **4** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz)，在芳香區中 (圖 26) 有 δ_{H} 6.69 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-2', 6') 與 δ_{H} 7.03 (2H, d, $J = 8.4\text{ Hz}$, H-3', 5') 兩組吸收訊號，推測有一個雙取代苯環存在。在 δ_{H} 4.04 (1H, dd, $J = 6.0, 1.8\text{ Hz}$, H-6) 和 4.35 (1H, t, $J = 4.1\text{ Hz}$, H-9) 有訊號存在，所以可以推測這兩個是屬於接於異原子的次甲基，且在 δ_{H} 1.79 (H_2 -4, m)、1.23 (1H, t, $J = 10\text{ Hz}$, H_a -5) 和 δ_{H} 2.08 (1H, t, $J = 6.0\text{ Hz}$, H_b -5)、3.04 (2H, m, H_2 -10)、3.33 和 3.53 (each 1H, m, H_2 -3) 有亞甲基吸收訊號存在。

由碳譜 (圖 27) 可知，有兩個羰基的吸收訊號在 δ_{C} 167.0 (C-1) 和 δ_{C} 170.8 (C-7) 有吸收，同時在 δ_{C} 127.6 (C-1')、132.1 (C-2')、116.2 (C-3')、116.2 (C-5') 和 132.1 (C-6') 發現一組屬於苯環的訊號，而在 δ_{C} 157.7 (C-4') 有吸收

訊號，並且配合氫譜上兩組鄰位的苯環上之質子訊號，可以得知在此碳上會接有異原子。又由於紅外光譜的佐證發現此結構含有醯胺基與羥基，故推論此異原子為羥基。在 δ_C 45.9 (C-3)、60.1 (C-9)、57.9 (C-6) 有吸收訊號，發現與化合物 **3** 相似，所以應該具有相同的結構骨架。與化合物 **3** 做比對後，推測此化合物平面結構為 cyclo-Pro-Tyr，具有兩個立體中心。利用鹽酸水解為兩個單胺基酸，使用可分析胺基酸鏡相異構物的 HPLC 管柱，再分別與 L-Pro 和 L-Tyr 之標準品的滯留時間比對，其滯留時間分別為 L-Pro (5.23 min) 及 L-Tyr (18.92 min)，綜合以上數據確認結構為 cyclo-L-Pro-L-Tyr^{46, 54}。

表 6、¹H- and ¹³C-NMR data of **4** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H
1	167.0	
3	45.9	3.33 (1H, m) 3.53 (1H, m)
4	22.7	1.79 (2H, m)
5	37.7	1.23 (1H, t, <i>J</i> = 10 Hz) 2.08 (1H, t, <i>J</i> = 6.0 Hz)
6	57.9	4.04 (1H, dd, <i>J</i> = 6.0, 1.8 Hz)
7	170.8	
9	60.1	4.35 (1H, t, <i>J</i> = 4.1 Hz)
10	29.4	3.04 (2H, m)
Ar		
1'	127.6	
2'	132.1	6.69 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
3'	116.2	7.03 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
4'	157.7	
5'	116.2	7.03 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)
6'	132.1	6.69 (1H, d, <i>J</i> = 8.4 Hz)

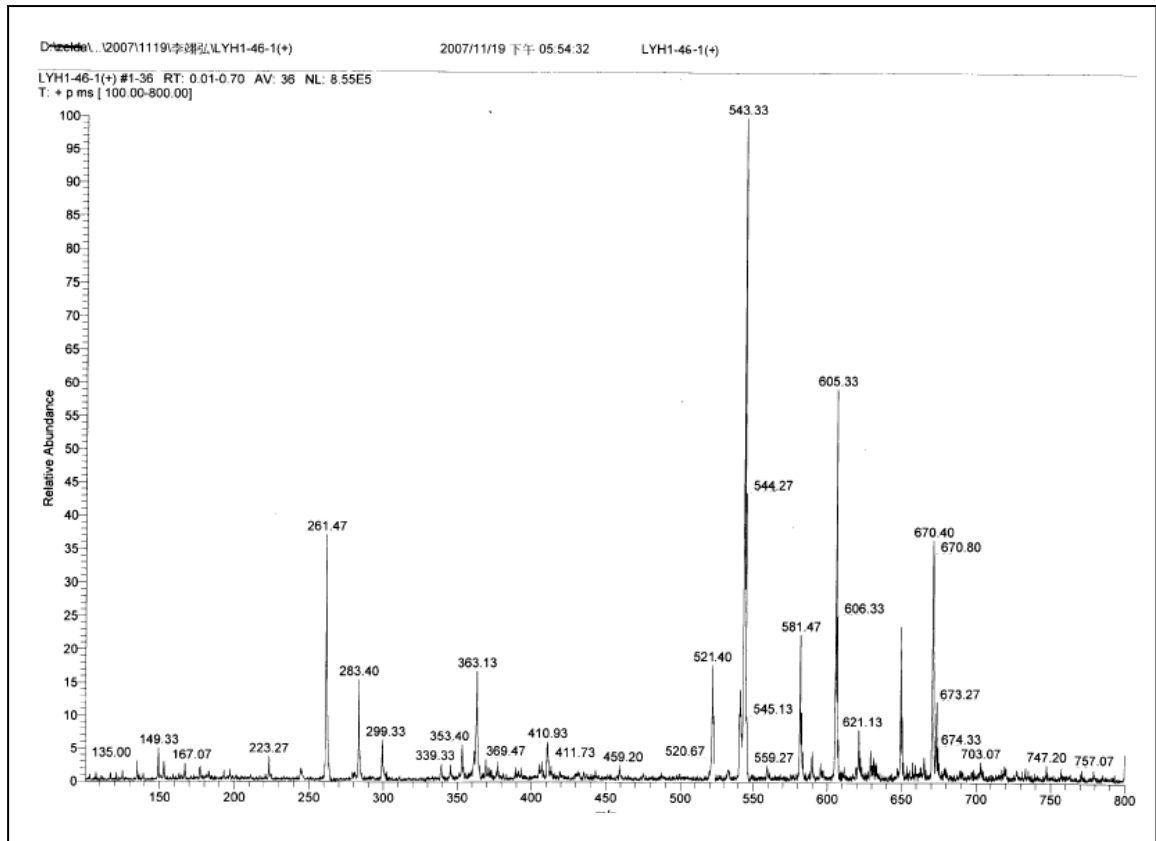


圖 23、化合物 4 之電噴灑電離質譜。

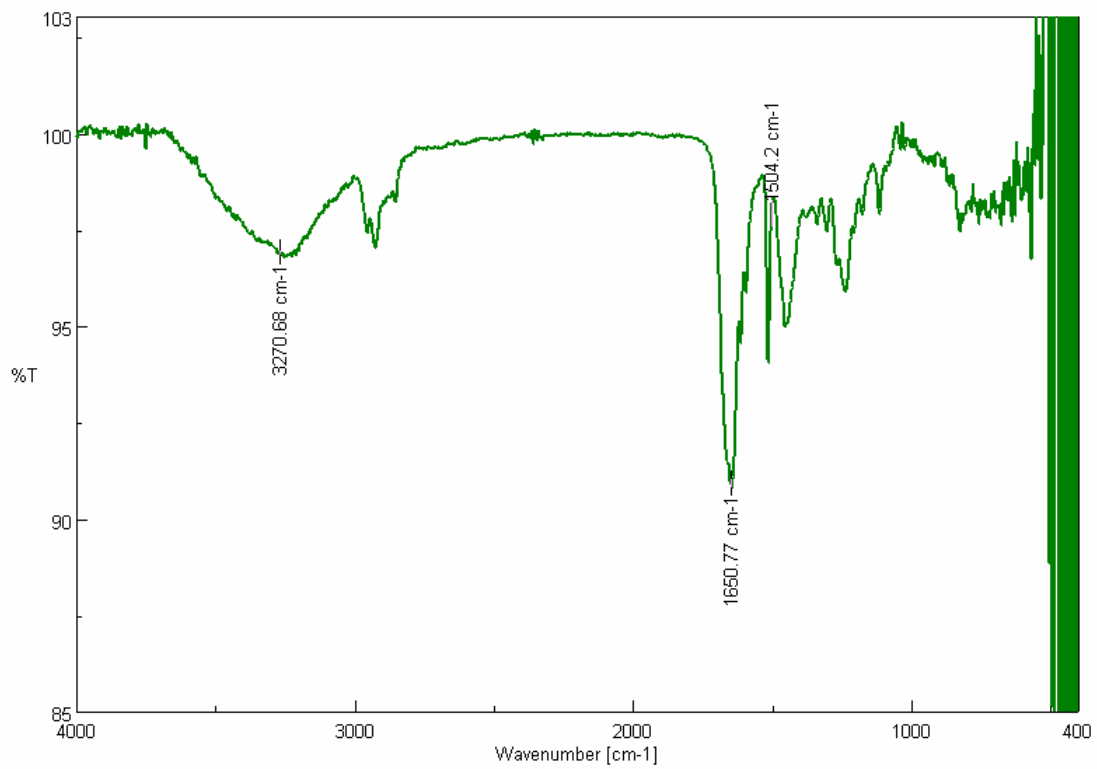


圖 24、化合物 4 之紅外光譜。

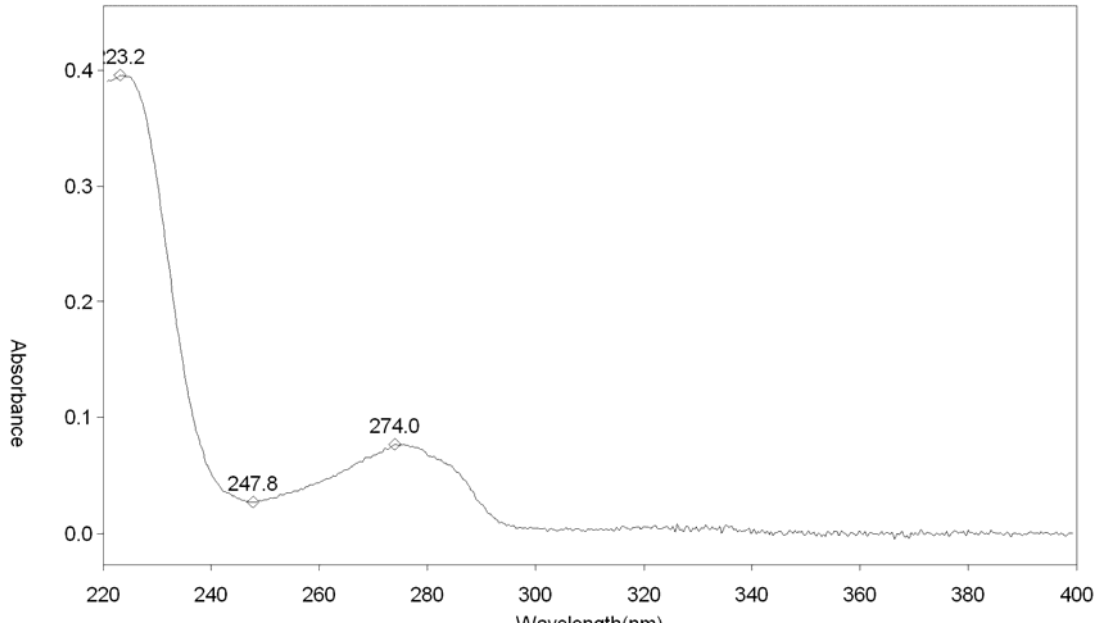


圖 25、化合物 4 之紫外光譜。

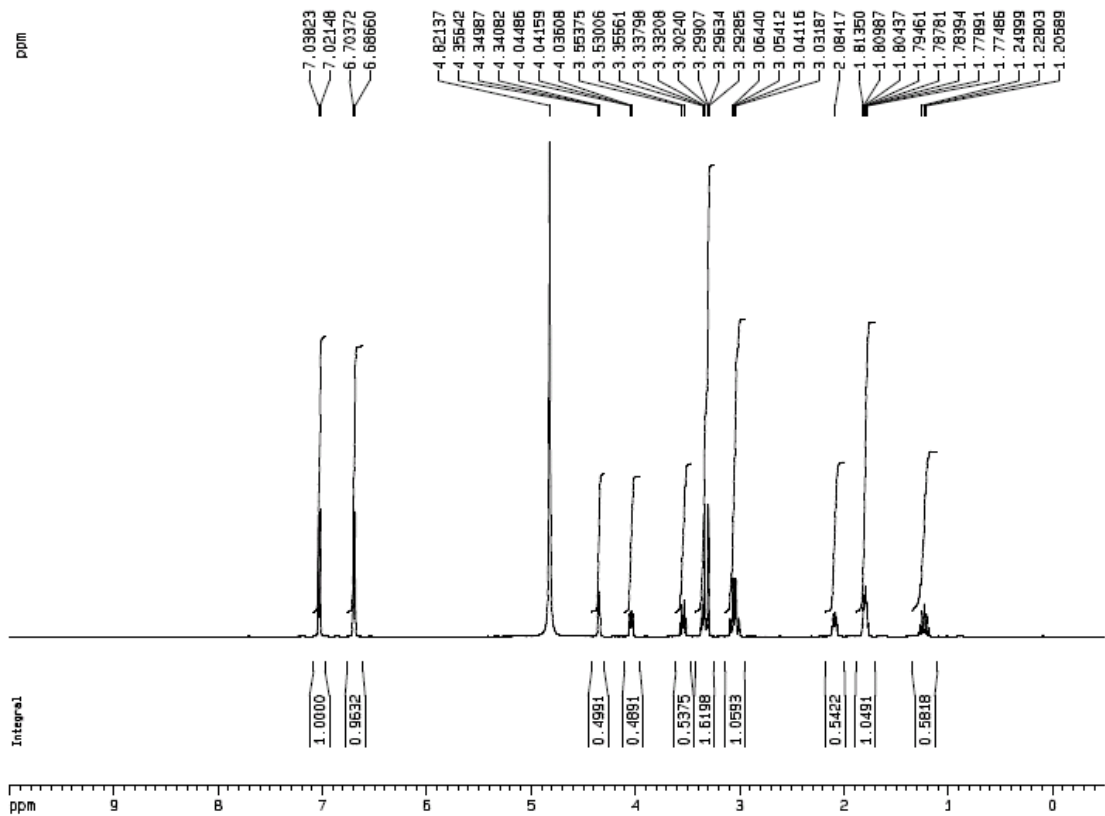


圖 26、化合物 4 之氫譜。

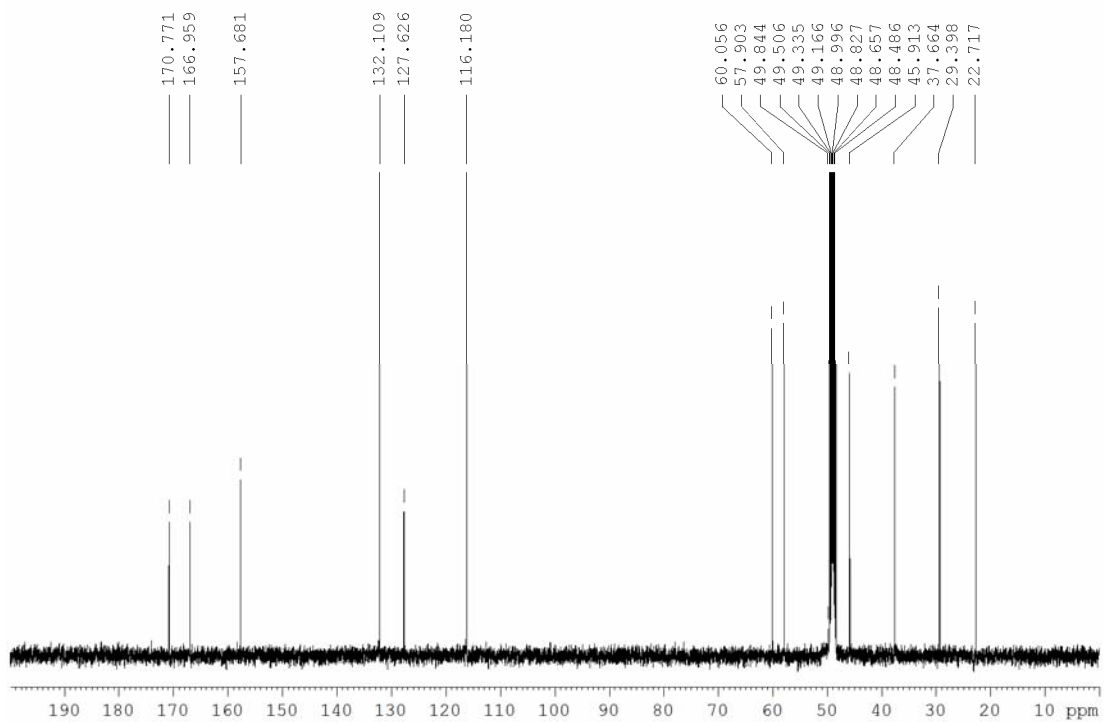
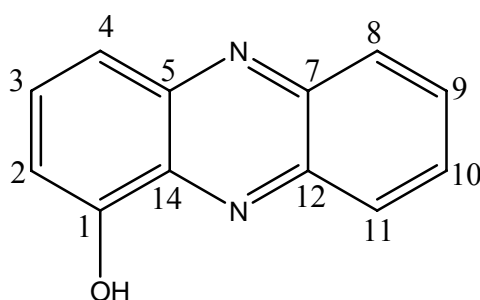


圖 27、化合物 4 之碳譜。

2.1.5 Hydroxyphenazine (5) 的結構解析



化合物 **5** 為深褐色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +14.8^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 197 (圖 28)。紅外光譜顯示有煙基 (3290 cm^{-1}) 及苯環 ($1501, 1602\text{ cm}^{-1}$) 等官能基 (圖 29)。紫外光譜在 263 及 366 nm 有最大吸收 (圖 30)。

化合物 **5** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz)(圖 31)，經解析後顯示多組吸收訊號出現在芳香區 δ_{H} 7.0 ~ 8.5 之間，推測有苯環結構的存在。由 COSY 實驗得知 (圖 33)， δ_{H} 7.67 (H-4) 與 7.78 (H-3) 有相關，以及 δ_{H} 7.18 (H-2) 與 δ_{H} 7.78 (H-3) 有相關，由 HMBC 實驗得知 (圖 34)， δ_{H} 7.78 (H-3) 與 δ_{C} 145.1 (C-5) 及 δ_{C} 154.9 (C-1) 有相關， δ_{H} 7.67 (H-4) 與 δ_{C} 111.2 (C-2) 及 δ_{C} 137.3 (C-14) 有相關， δ_{H} 7.18 (H-2) 與 δ_{C} 119.8 (C-4)、154.9 (C-1) 及 137.3 (C-14) 有相關，得知有一個三取代的苯環；再由 COSY 實驗得知， δ_{H} 8.31 (H-11) 與 7.90 (H-10)、 δ_{H} 7.90 (H-9) 與 7.87 (H-10) 及 δ_{H} 8.17 (H-8) 與 7.87 (H-9) 有相關，由 HMBC 實驗得知， δ_{H} 8.31 (H-11) 與 δ_{C} 132.4 (C-9) 及 144.5 (C-7)、 δ_{H} 7.90 (H-9) 與 δ_{C} 144.5 (C-7) 及 130.6 (C-11)、 δ_{H} 7.87 (H-10) 與 δ_{C} 129.8 (C-8) 及

142.9 (C-12) 和 δ_{H} 8.17 (H-8) 與 δ_{C} 131.5 (C-10) 及 δ_{C} 142.9 (C-12) 有相關，推測結構中另有一個鄰位雙取代苯環結構。由碳譜得知 (圖 32)， δ_{C} 154.9 (C-1)、 δ_{C} 137.3 (C-14)、 δ_{C} 145.1 (C-5)、 δ_{C} 144.5 (C-7) 和 δ_{C} 142.96 (C-12) 是四級碳，在較低的場域，推測此五個碳接有異原子，其中 δ_{C} 154.9 (C-1) 場域最低，推測接有氧原子。再由 HMBC 實驗中，兩個苯環間沒有互有相關的訊號，推測兩個苯環結構由兩個異原子接合在一起，輔以 ESI/MS 所測得之分子量，推測此二個異原子應是氮原子。經與文獻比對後，確認化合物 **5** 的結構為 hydroxyphenazine³³，是屬於已知物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 7。

表 7、¹H- and ¹³C-NMR data of **5** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H	HMBC (H→C)	COSY
1	154.9			
2	111.2	7.18 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)	1, 4, 14	3
3	133.4	7.78 (1H, dd, $J = 8.4, 7.0$ Hz)	1, 5	2, 4
4	119.8	7.67 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	2, 14	3
5	145.1			
7	144.5			
8	129.8	8.17 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	10, 12	9
9	132.4	7.90 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz)	7, 11	8, 10
10	131.5	7.87 (1H, dd, $J = 8.4$ Hz)	8, 12	9, 11
11	130.6	8.31 (1H, d, $J = 8.4$ Hz)	7, 9	10
12	142.9			
14	137.3			

LYH1-47-2(+)#1-30 RT: 0.01-0.47 AV: 30 NL: 1.75E6
T: +p ms [100.00-800.00]

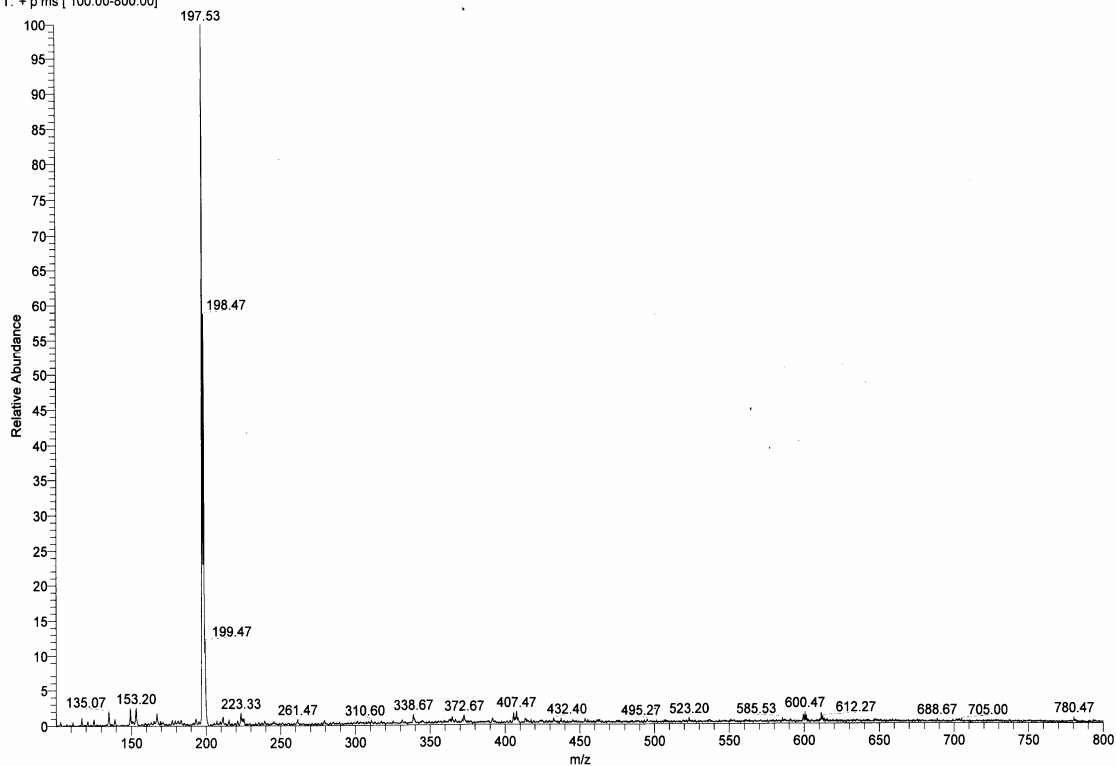


圖 28、化合物 5 之電噴灑電離質譜。

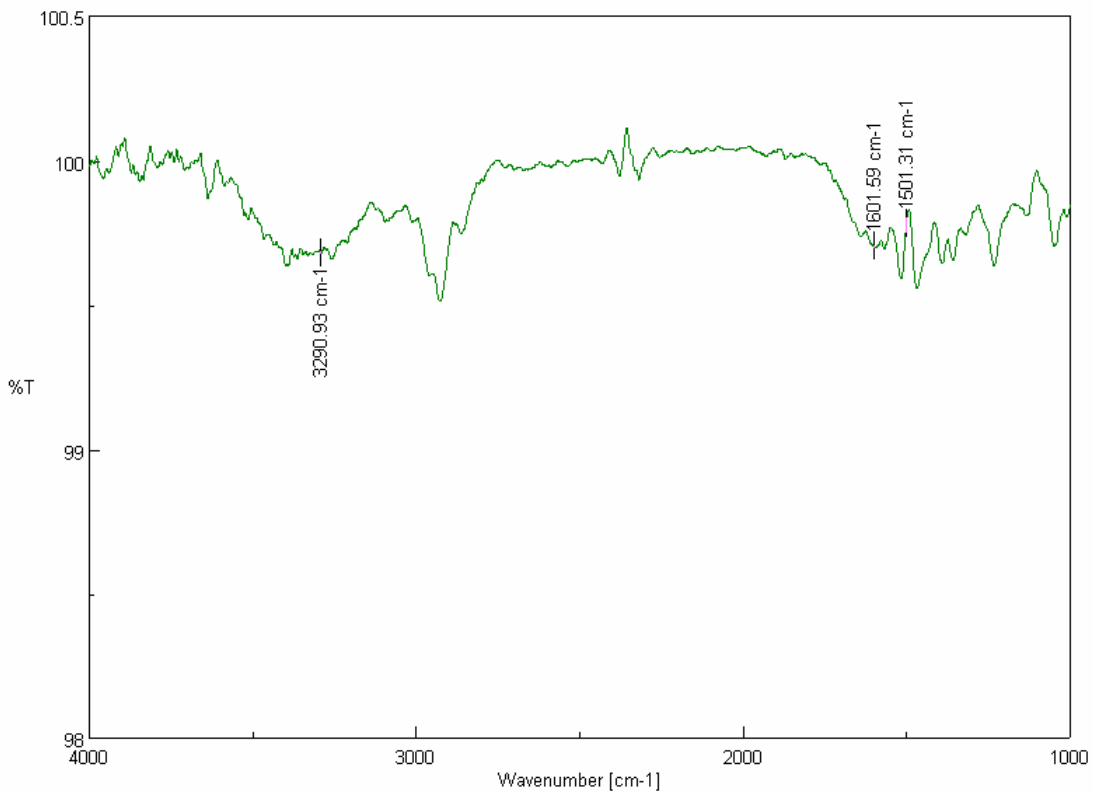


圖 29、化合物 5 之紅外光譜。

Scan Graph

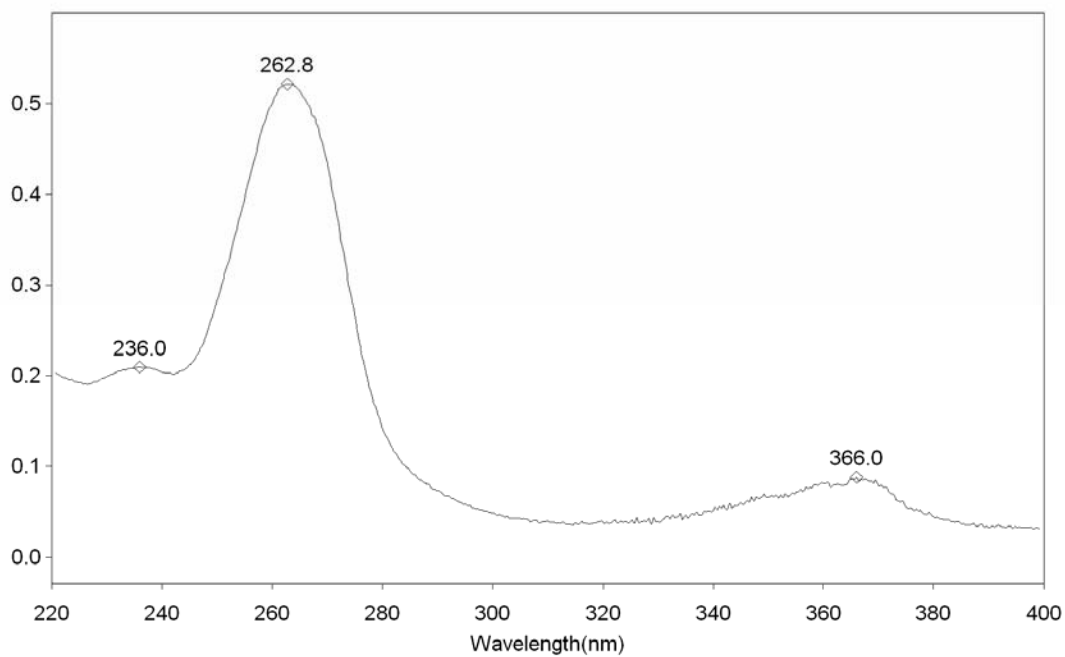


圖 30、化合物 5 之紫外光譜。

LYH1-47-2/CD300/10-H
0116-Jyh1472/1/1/th1ee

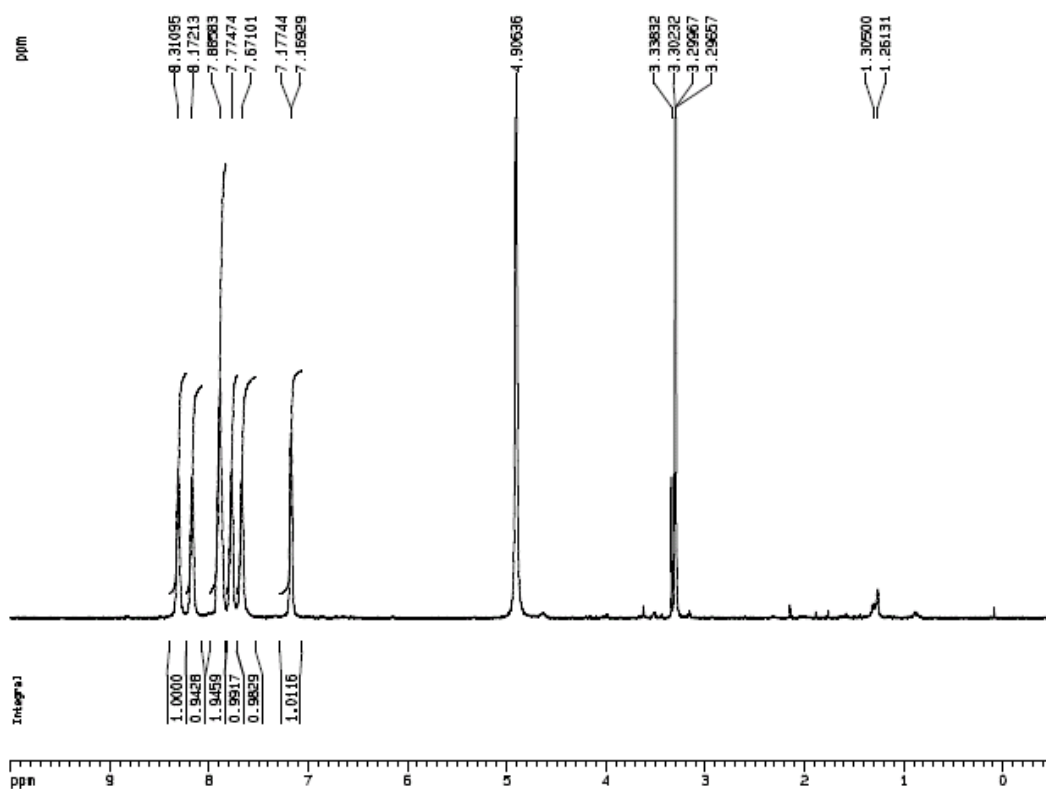


圖 31、化合物 5 之氫譜。

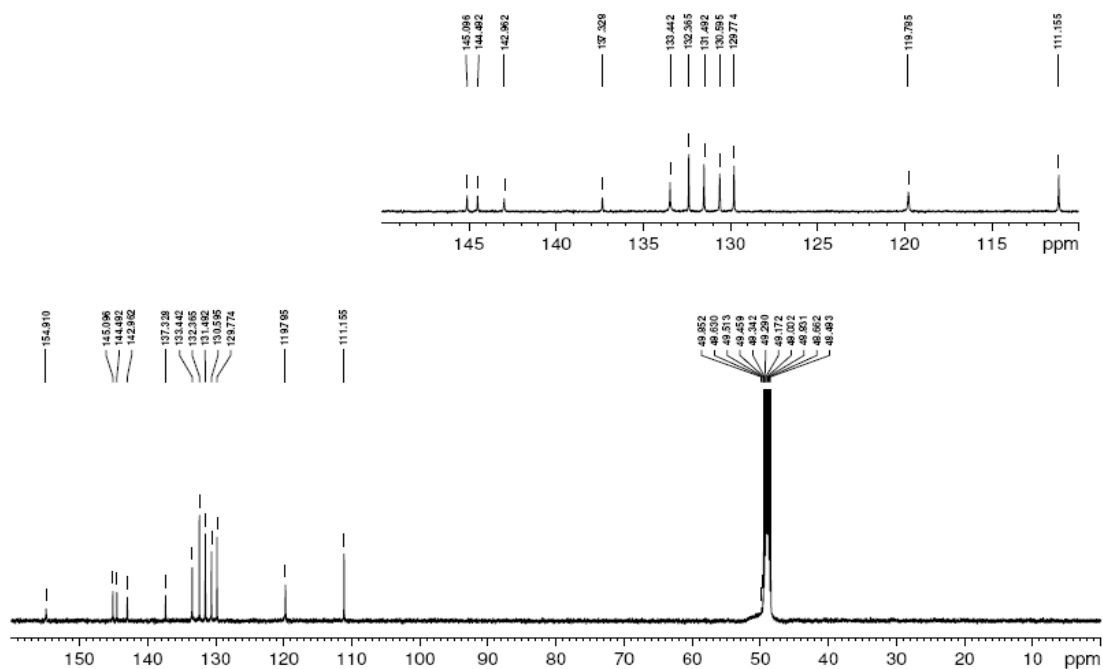


圖 32、化合物 5 之碳譜。

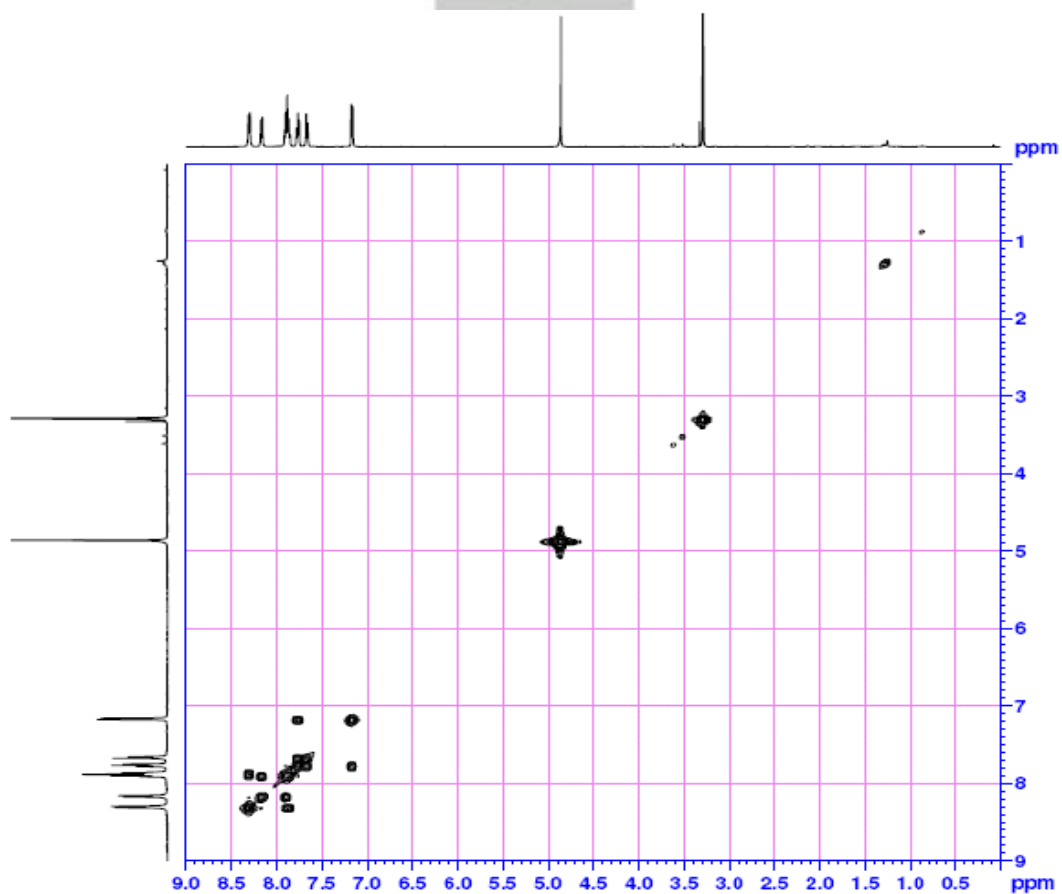


圖 33、化合物 5 之 COSY 圖譜。

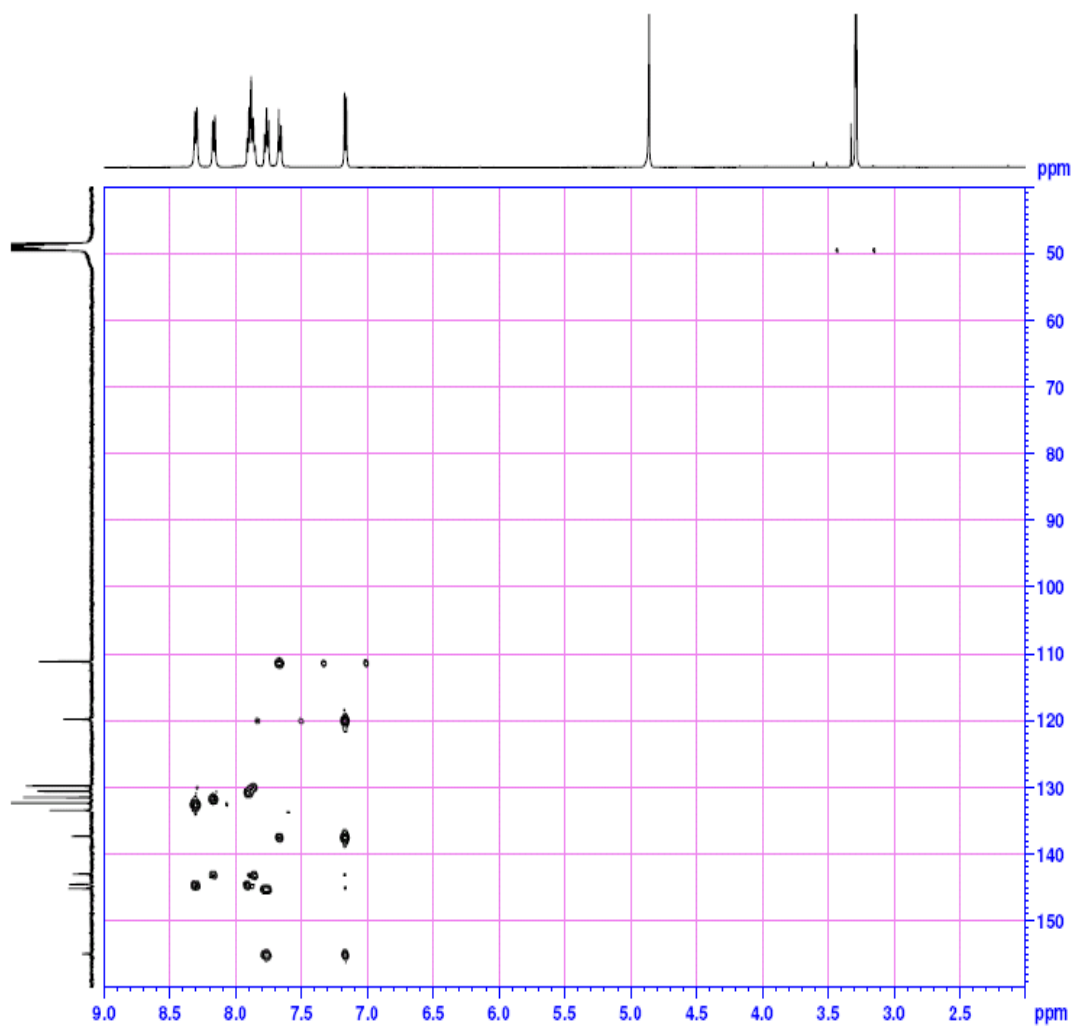
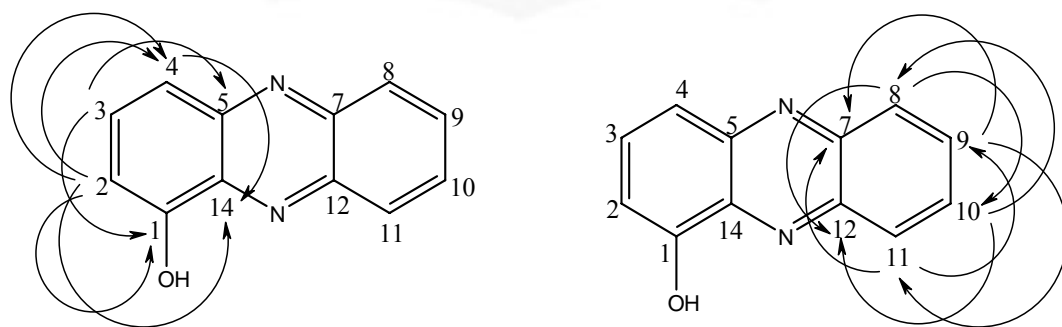
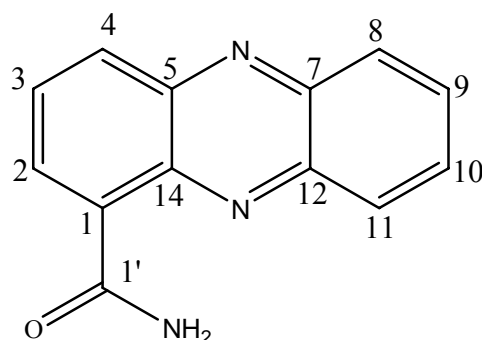


圖 34、化合物 5 之 HMBC 圖譜。



2.1.6 Phenazine-1-carboxamide (6) 之結構解析



化合物 **6** 為淺黃色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +19.4^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 224 (圖 35)。紅外光譜顯示有胺基 (3329 cm^{-1})、醯胺羰基 (1678 cm^{-1}) 及苯環 ($1620, 1522\text{ cm}^{-1}$) 等官能基 (圖 36)。紫外光譜在 248 和 366 nm 有最大吸收 (圖 37)。

化合物 **6** 的氫譜 (CDCl_3 , 500 MHz)(圖 38)，經解析後顯示多組吸收訊號出現在芳香區 δ_H 7.95 ~ 9.01 之間，推測有苯環結構存在。在氫譜上訊號分成兩群，分別為 δ_H 9.02 (1H, dd, $J = 1.1, 1.1\text{ Hz}$, H-2)、8.43 (1H, dd, $J = 1.1, 7.5\text{ Hz}$, H-3) 及 7.97 (1H, d, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-4) 與 δ_H 8.22 (1H, dd, $J = 2.5, 3.8\text{ Hz}$, H-8)、 δ_H 8.28 (1H, dd, $J = 2.5, 3.8\text{ Hz}$, H-11) 及 δ_H 7.95 (2H, m, H-9, 10)。由此預測，結構中會有兩個苯環結構。由碳譜得知 (圖 39)，亦可將訊號分成兩群，分別為 δ_C 134.3 (C-1)、131.7 (C-2)、131.0 (C-3)、135.9 (C-4) 及 143.2 (C-5) 和 δ_C 129.8 (C-8)、130.0 (C-9)、129.9 (C-10) 及 129.1 (C-11)。在較低場域中有吸收訊號在 143.2 (C-5)、 δ_C 140.8 (C-7)、 δ_C 141.5 (C-12)、 δ_C 143.5 (C-14) 和 δ_C 166.6 (C-1')，推測此五個碳接有異原子，其中 δ_C 166.6 (C-1') 場域最低，

推測為一個醯胺羰基訊號。此與紅外光譜的解析相符。經與化合物 **5** 加以比較，碳譜僅在 C-1 位置有不同，推測醯胺羰基是接在 C-1 位置。再與文獻比對後，確認化合物 **6** 的結構為 Phenazine-1-carboxamide³³，是屬於已知物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 8。

表 8、¹H- and ¹³C-NMR data of **6** (CDCl₃, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H
1	134.3	
2	131.7	9.02 (1H, dd, <i>J</i> = 1.1, 1.1 Hz)
3	131.0	8.43 (1H, dd, <i>J</i> = 1.1, 7.5 Hz)
4	135.9	7.97 (1H, d, <i>J</i> = 7.5 Hz)
5	143.2	
7	140.8	
8	129.8	8.22 (1H, dd, <i>J</i> = 2.5, 3.8 Hz)
9	130.0	7.95 (1H, m)
10	129.9	7.95 (1H, m)
11	129.1	8.28 (1H, dd, <i>J</i> = 2.5, 3.8 Hz)
12	141.6	
14	143.5	
1'	166.6	

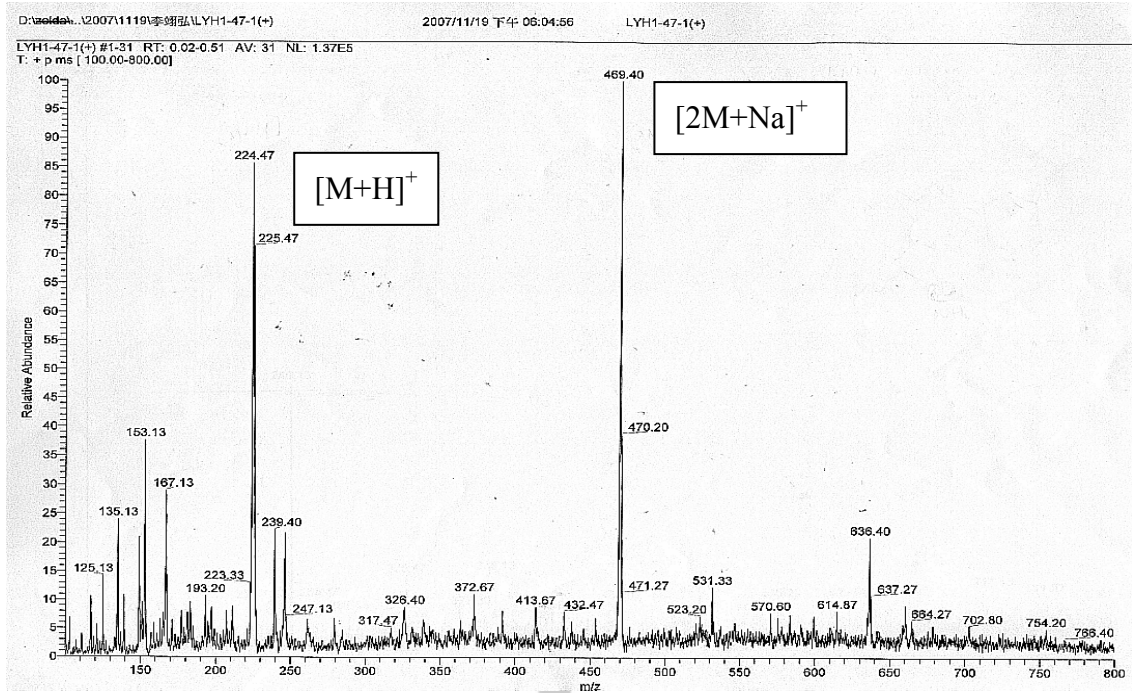


圖 35、化合物 6 之電噴灑電離質譜。

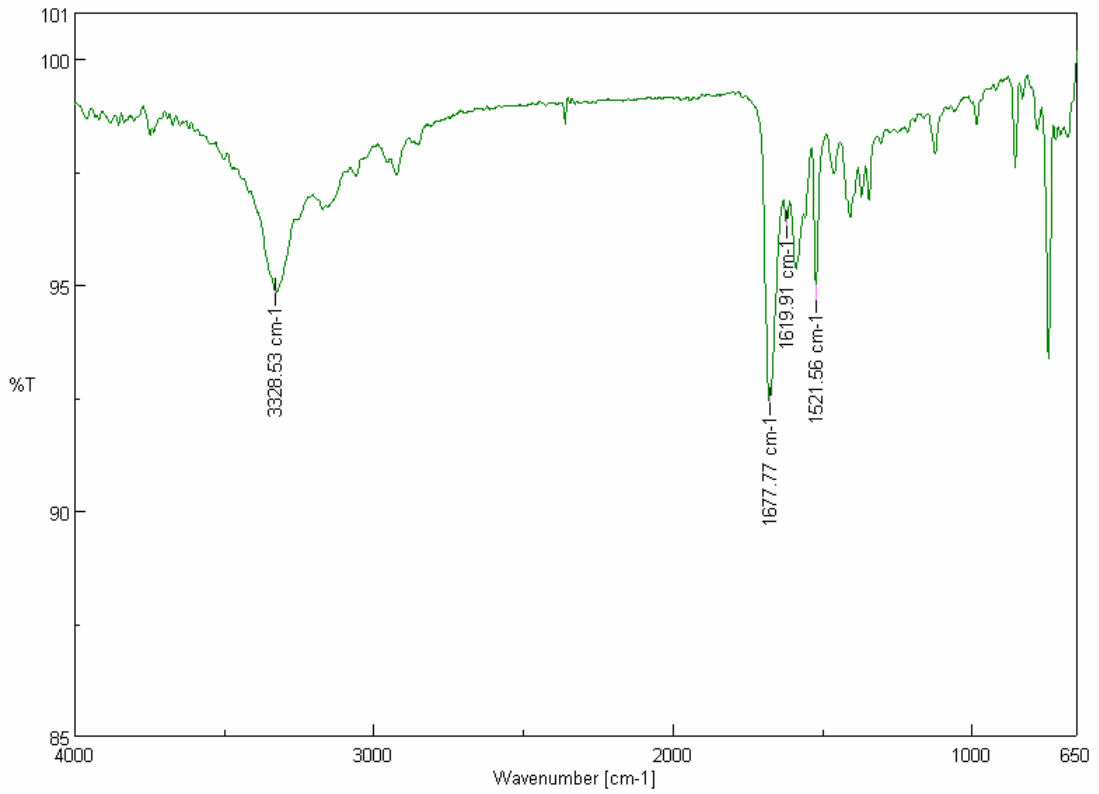


圖 36、化合物 6 之紅外光譜。

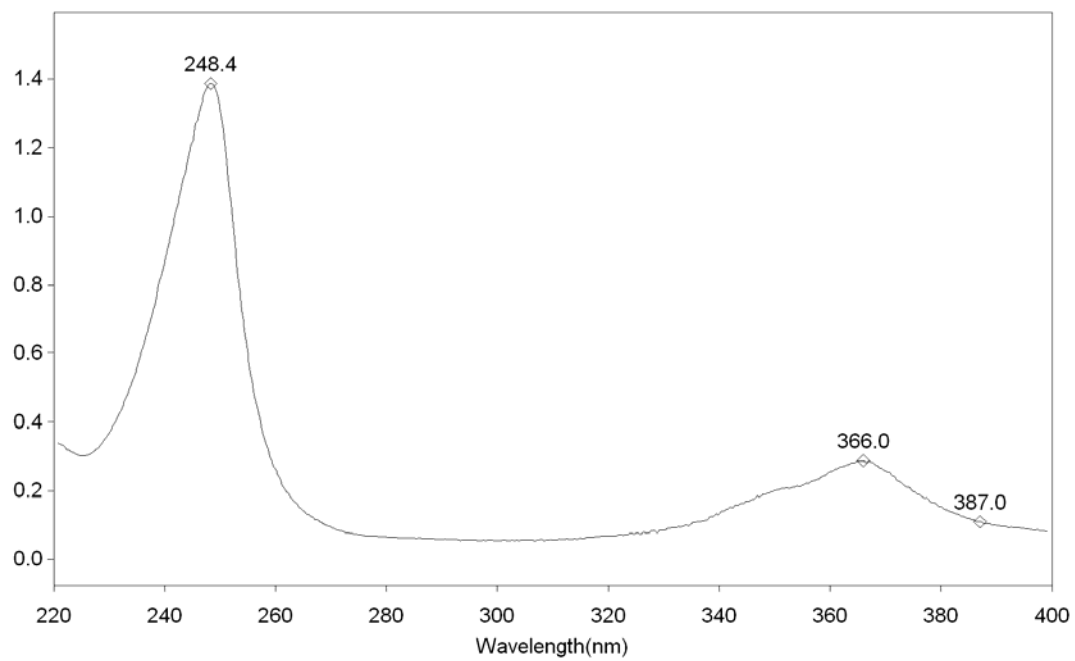


圖 37、化合物 6 之紫外光譜。

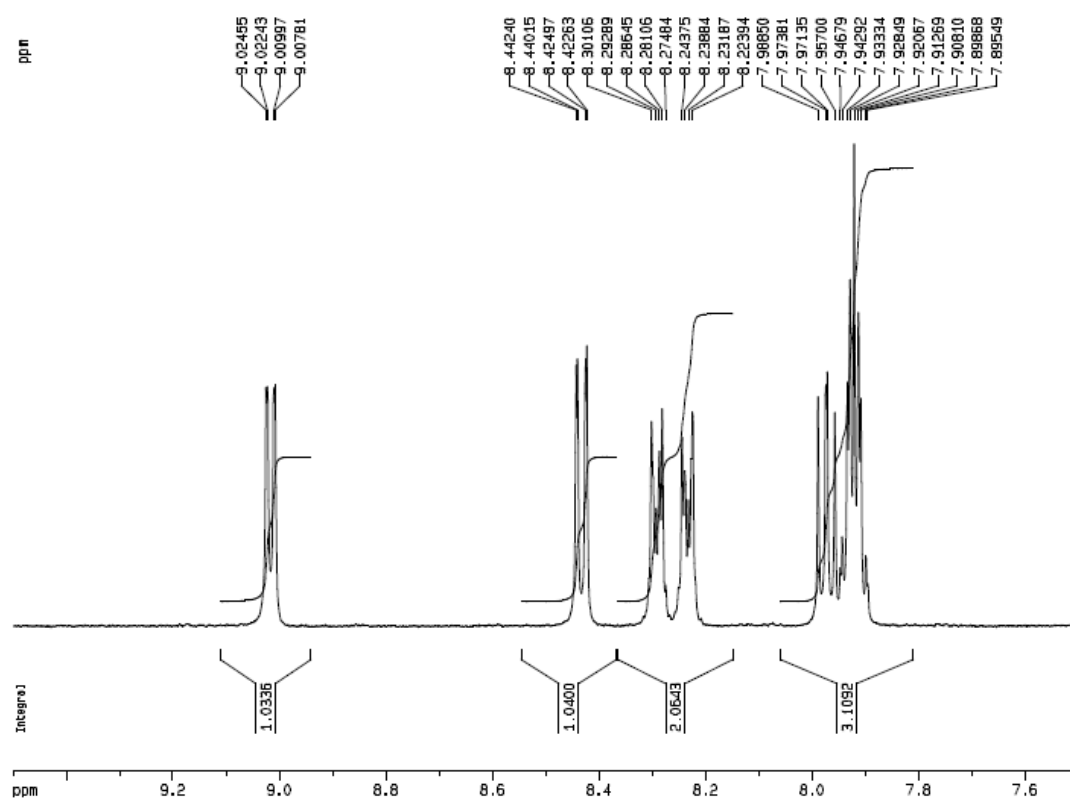
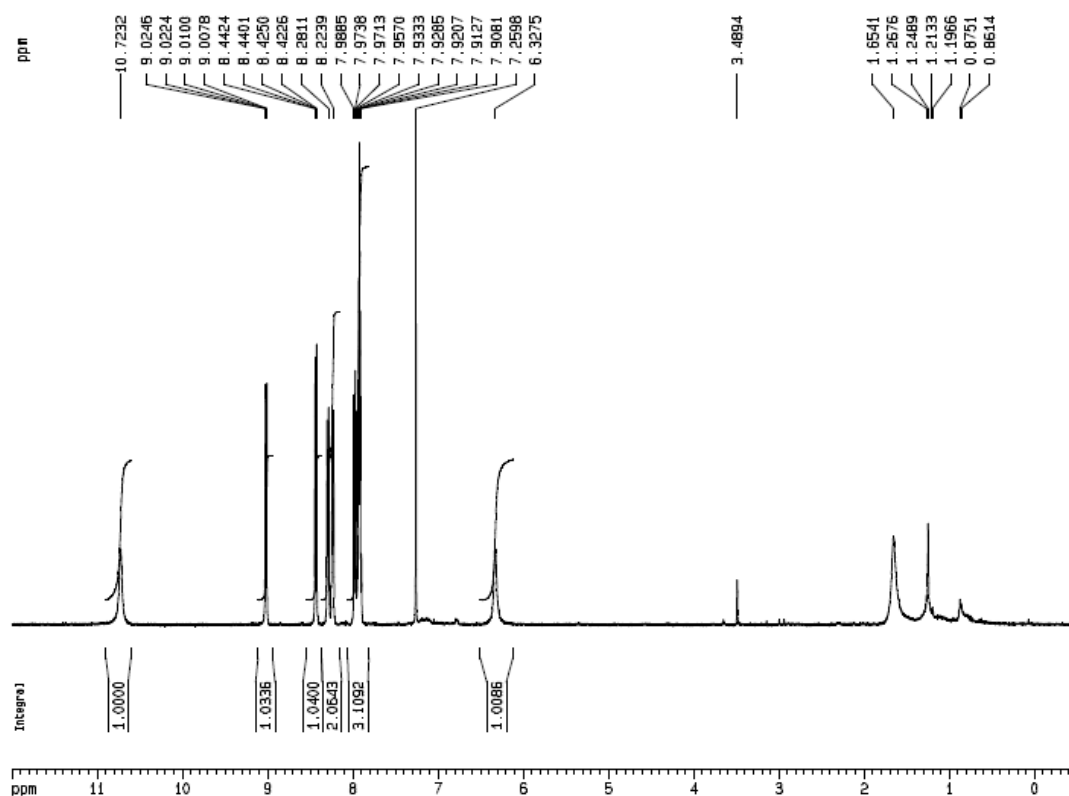


圖 38、化合物 6 之氫譜。

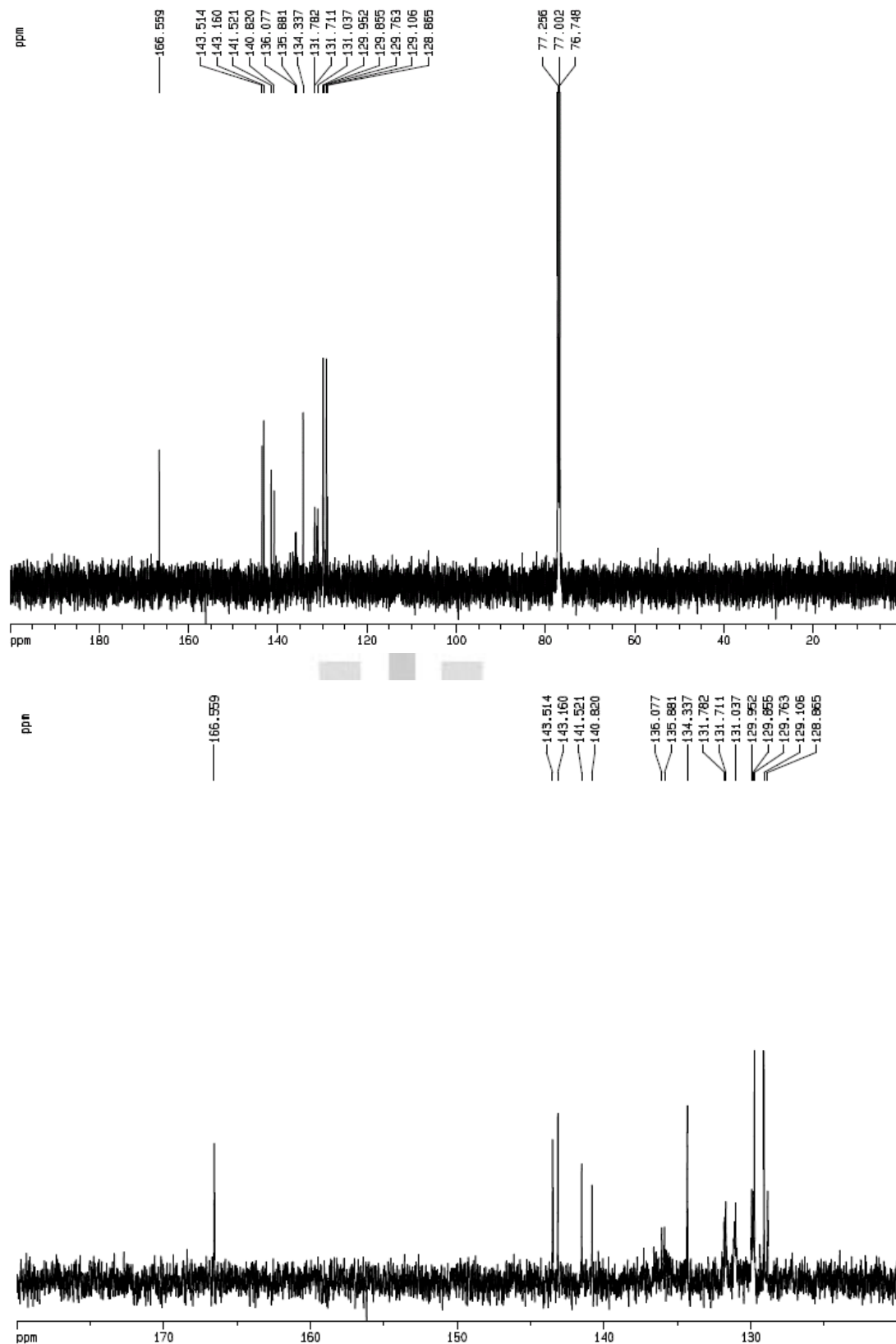
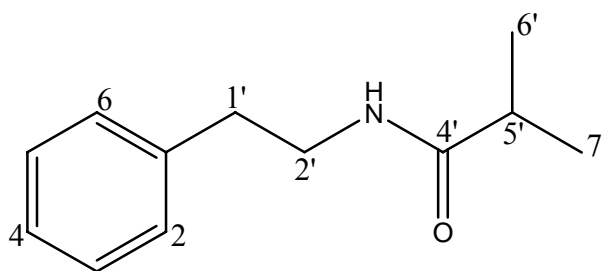


圖 39、化合物 6 之碳譜。

2.1.7 *N*-(2'-Phenylethyl)isobutyramide (**7**) 之結構解析



化合物 **7** 為無色透明無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +18.4^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 192 (圖 40)。紅外光譜顯示有胺基 (3296 cm^{-1}) 和醯胺羰基 (1635 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 41)，紫外光譜在 259 nm 有最大吸收 (圖 42)。

化合物 **7** 的氫譜 (CDCl_3 , 500 MHz)(圖 43) 顯示在芳香區中，顯示有 δ_H 7.25 (2H, m, H-2, 6)、7.20 (1H, m, H-4) 和 7.17 (2H, m, H-3, 5) 為一個單取代苯環；在高場域有一組雙重峰訊號位於 δ_H 1.05 (6H, d, $J = 6.9\text{ Hz}$, H-6')，為兩個末端甲基；在 δ_H 2.77 (2H, t, $J = 7.36\text{ Hz}$, C-1') 有一組三重峰訊號，為鄰近苯環的亞甲基；在較低場域 δ_H 3.38 (2H, t, $J = 7.4\text{ Hz}$, C-2') 有一組吸收訊號，為接有異原子的亞甲基。經由 ESI/MS 結果顯示化合物 **7** 之分子量為奇數，推測該異原子為氮；由碳譜顯示 (圖 44)， δ_C 140.5 (C-1)、129.4 (C-2, 6)、127.3 (C-3, 5) 和 129.7 (C-4) 為一苯環訊號，其中 δ_C 140.5 是一個四級碳；在低場域有一吸收訊號位於 δ_C 180.1，推測為羰基的訊號。在 COSY 實驗中指出 (圖 45)， δ_H 1.05 (H₃-6', 7') 與 δ_H 2.35 (H-5') 相關，形成了一個異丙基；

δ_{H} 2.77 (H₂-1') 與 δ_{H} 3.38 (H₂-2') 相關。由 HMBC 實驗 (圖 46) 得知, δ_{H} 1.05 (H₃-6', 7') 與 δ_{C} 36.2 (C-5') 及 180.1 (C-4') 相關, 以及 δ_{H} 2.35 (H-5') 與 δ_{C} 180.1 (C-4') 相關, 推測在較低場域的訊號 δ_{H} 2.35 (H-5'), 旁邊接有醃胺羰基; δ_{H} 3.38 (H₂-2') 與 δ_{C} 180.1 (C-4') 及 36.5 (C-1') 有相關, 推測 C-4' 為一個醃胺羰基且連接異丙基 (C-5' ~ C7'); δ_{H} 2.77 (H₂-1') 與 δ_{C} 140.6 (C-1) 及 41.85 (C-2') 相關, 可推測此長側鏈在 δ_{C} 36.5 (C-1') 與苯環上的 δ_{C} 140.6 (C-1) 連接。上述解析經與文獻比對後, 確認化合物 **7** 的結構為 *N*-(2'-Phenylethyl)isobutyramide⁵⁵, 是屬於已知物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 9。

表 9、¹H- and ¹³C-NMR data of **7** (CDCl₃, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H	HMBC (H→C)	COSY
1	140.6			
2	129.4	7.25 (1H, m)	1, 3	3
3	129.9	7.17 (1H, m)	2, 6	2, 4
4	127.3	7.20 (1H, m)		3, 5
5	129.9	7.17 (1H, m)	3, 6	4, 6
6	129.4	7.25 (1H, m)	1, 5	5
1'	36.5	2.77 (2H, t, <i>J</i> = 7.0 Hz)	1, 2'	2'
2'	41.9	3.38 (2H, t, <i>J</i> = 7.0 Hz)	1, 1', 4'	1'
N				
4'	180.1			
5'	36.3	2.35 (1H, dq, <i>J</i> = 6.9, 6.9 Hz)	6'	6'
6'	19.9	1.05 (3H, d, <i>J</i> = 6.9 Hz)	4', 5'	5', 7'
7'	19.9	1.05 (3H, d, <i>J</i> = 6.9 Hz)	6', 5', 4'	6'

LYH1-60-1(+)#1-33 RT: 0.01-0.51 AV: 33 NL: 4.24E6
T: + p ms [100.00-800.00]

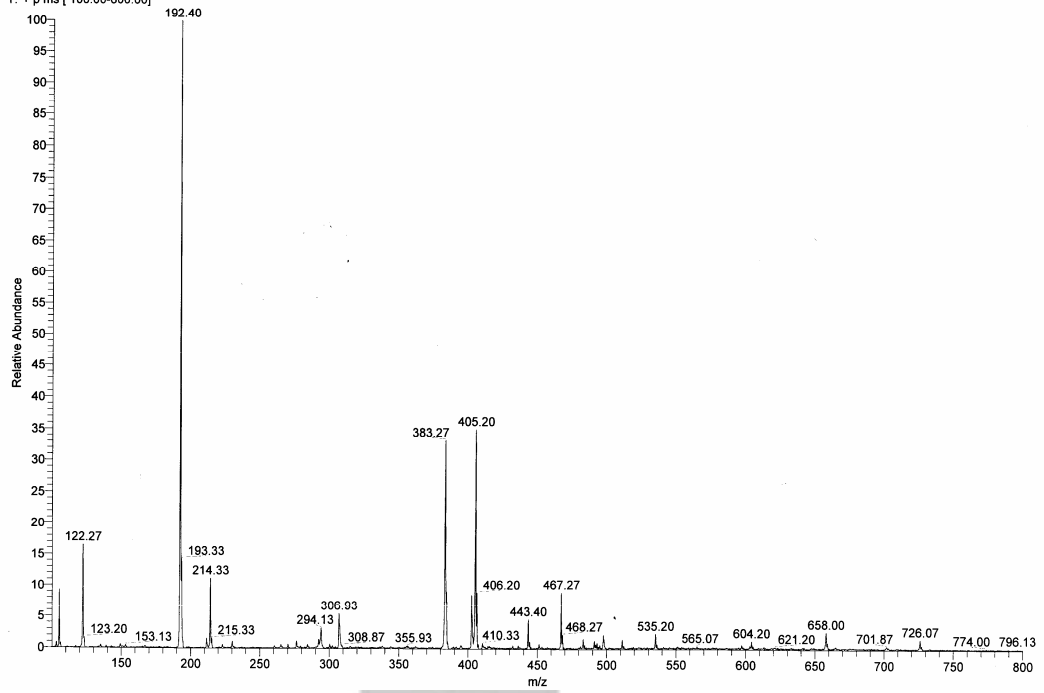


圖 40、化合物 7 之電噴灑電離質譜。

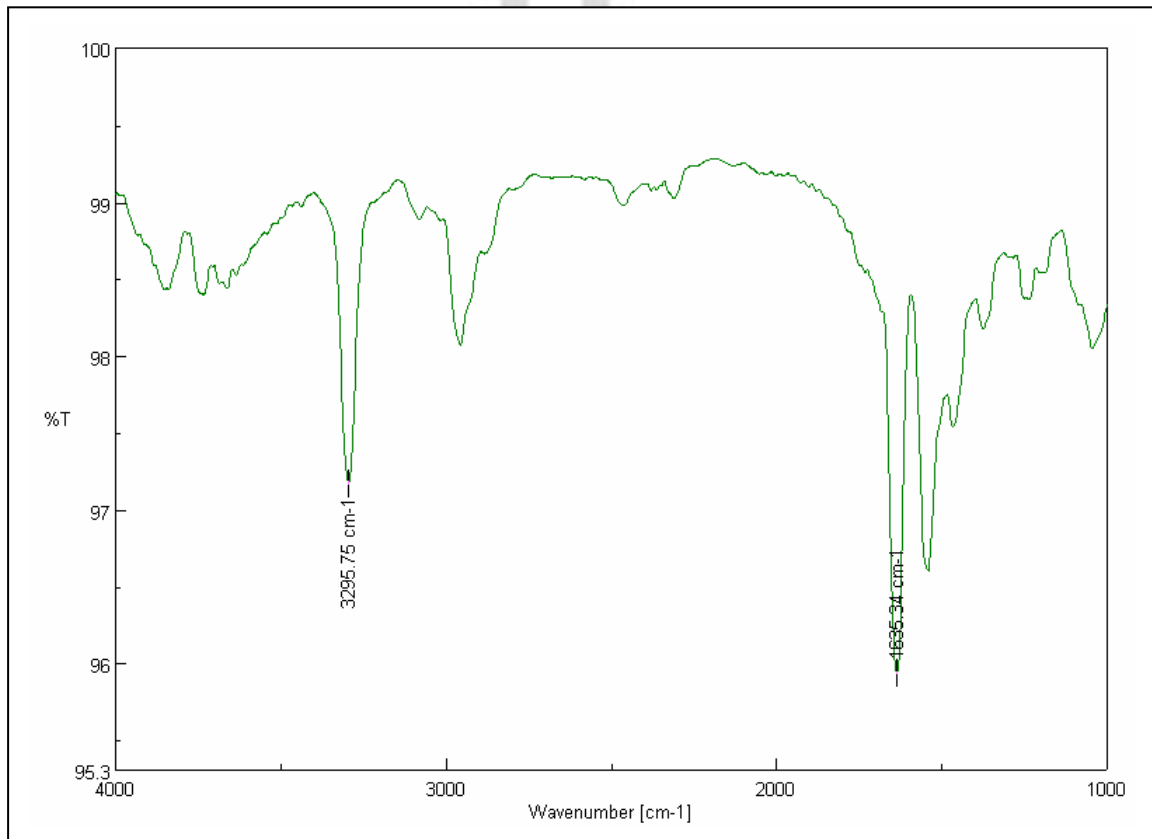


圖 41、化合物 7 之紅外光譜。

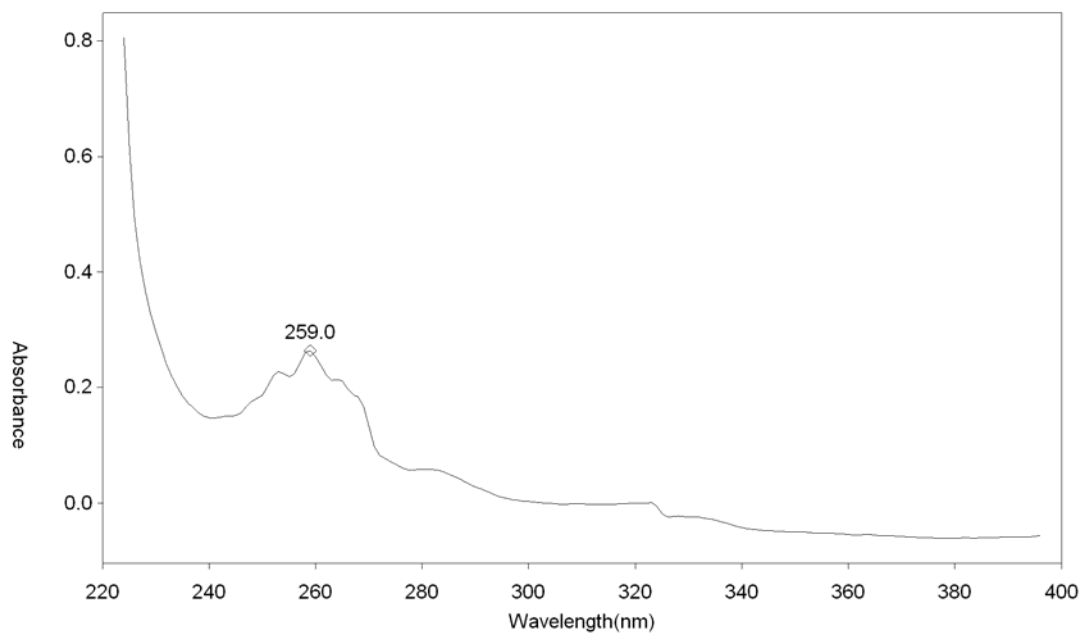


圖 42、化合物 7 之紫外光譜。

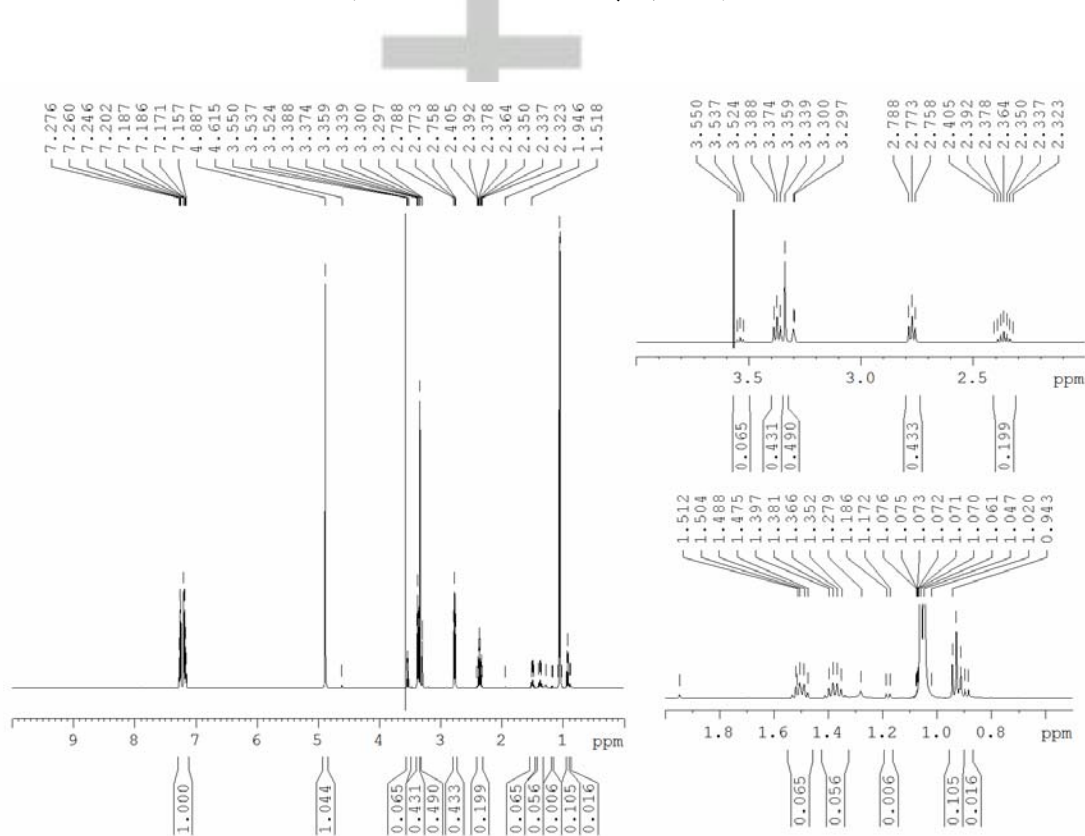


圖 43、化合物 7 之氫譜。

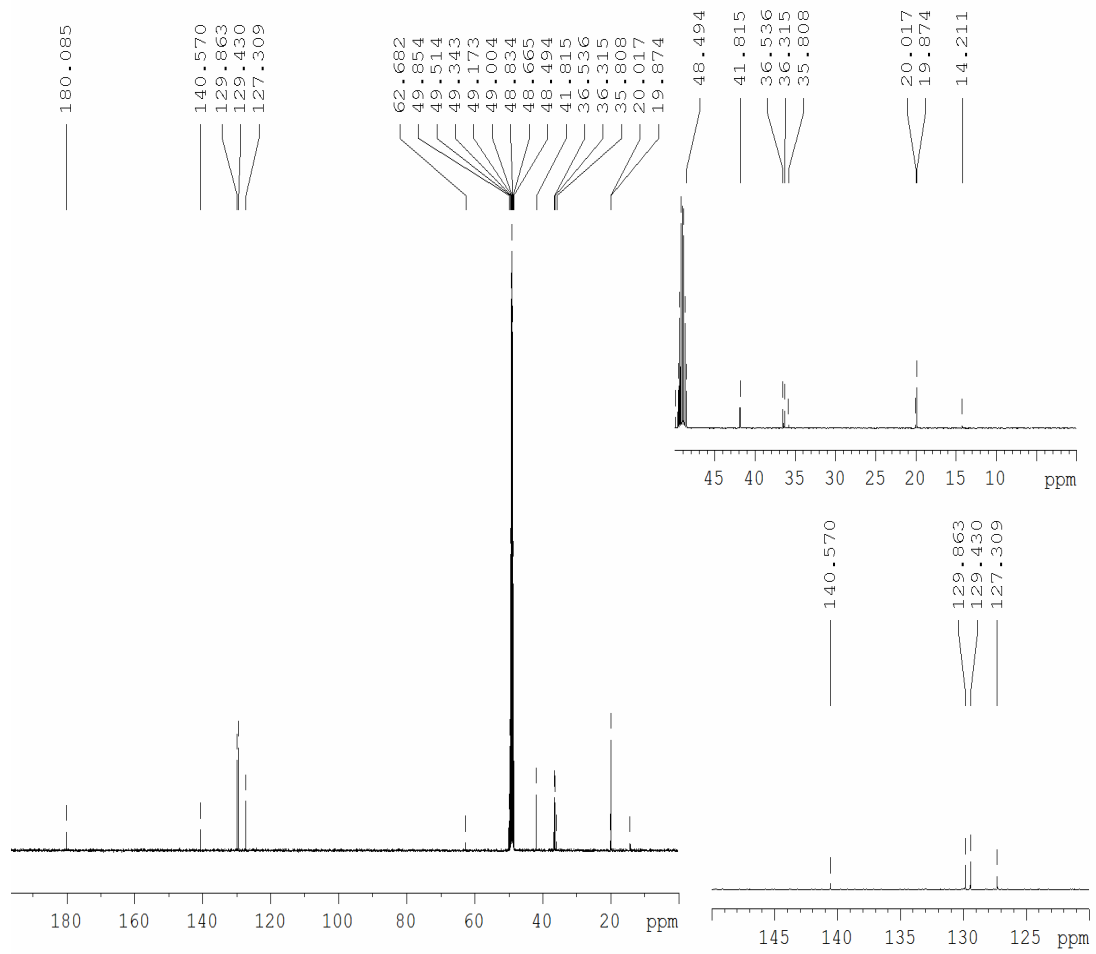


圖 44、化合物 7 之碳譜。

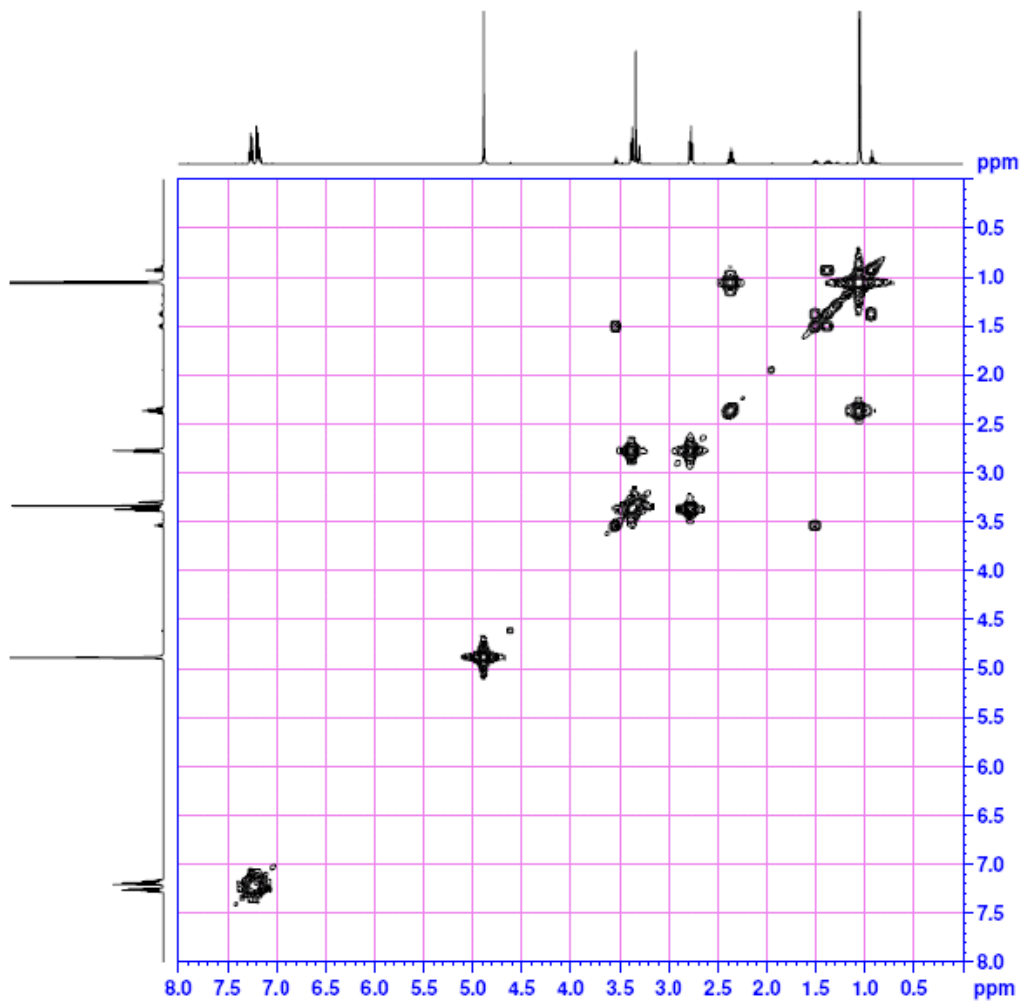
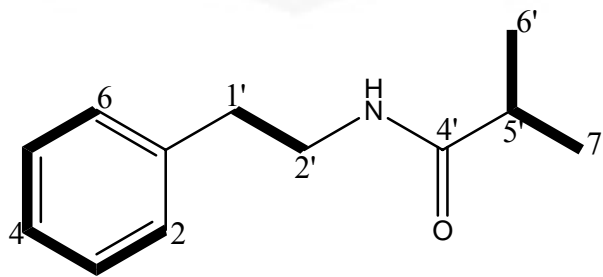


圖 45、化合物 7 之 COSY 圖譜。



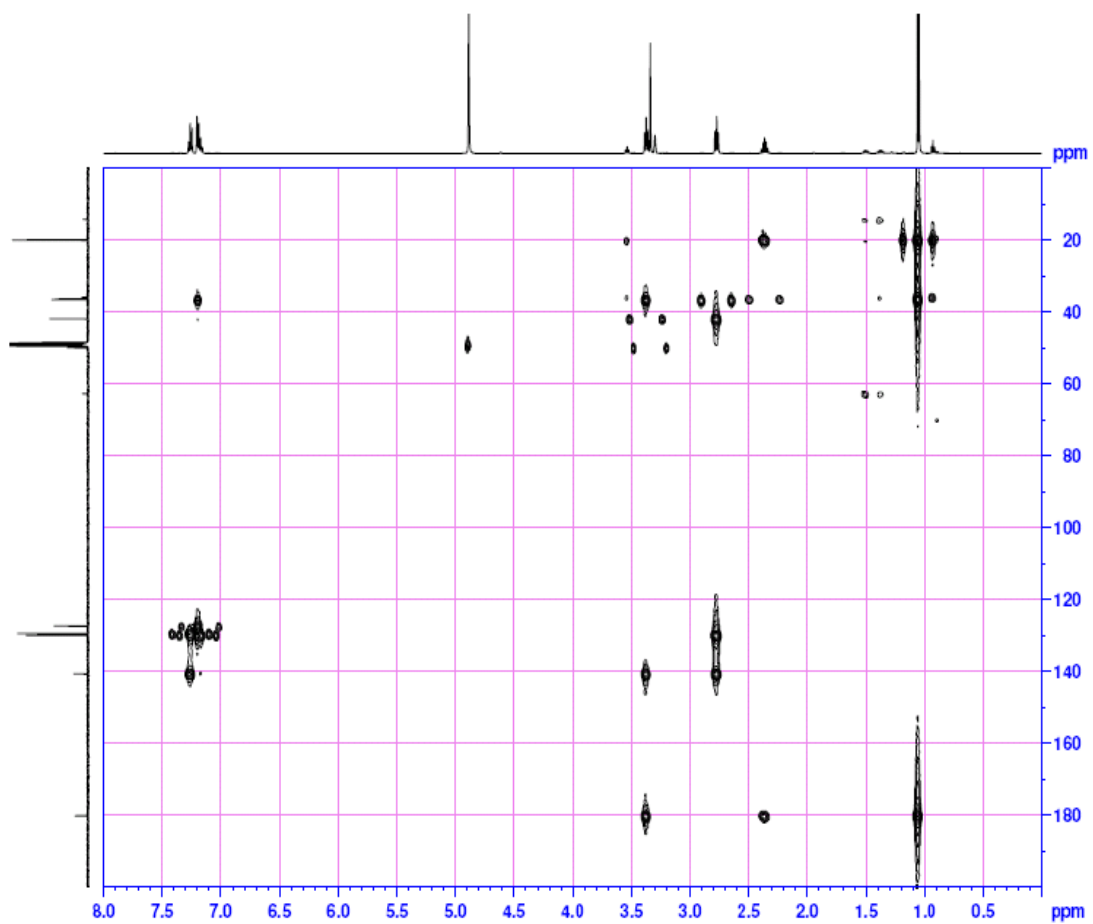
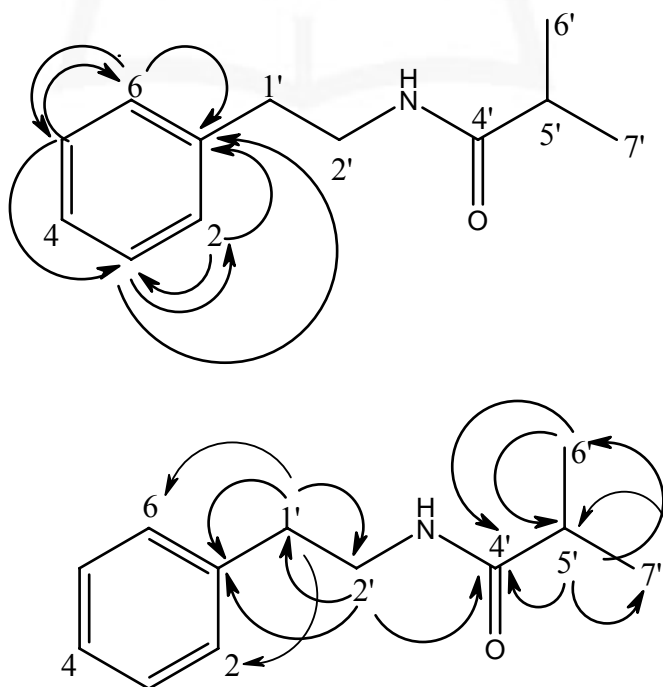
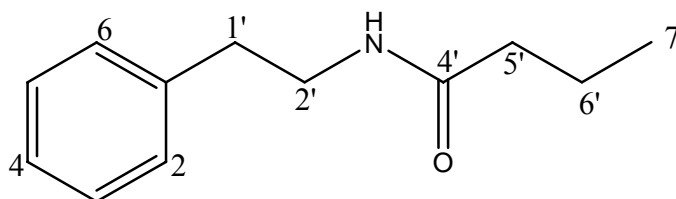


圖 46、化合物 7 之 HMBC 圖譜。



2.1.8 2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide (**8**) 之結構解析



化合物 **8** 為無色透明片狀結晶，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +4.18^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 192 (圖 47)。由紅外光譜顯示有胺基 (3294 cm^{-1}) 和醯胺羰基 (1643 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 48)，紫外光譜在 268 nm 有最大吸收 (圖 49)。

化合物 **8** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) 顯示在芳香區中 (圖 50)，訊號分成兩區，在低場域部份顯示有 δ_{H} 7.26 (1H, dd, $J = 7.3, 7.6$ Hz, H-2, 6)、7.20 (1H, brs, H-4) 和 7.17 (1H, dd, $J = 7.3, 7.6$ Hz, H-3, 5) 所以為一單取代的苯環；在高場域有一組雙重峰訊號位於 δ_{H} 0.89 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, H-7')，為一個末端甲基；在 δ_{H} 1.59 (2H, m, C-6') 和 δ_{H} 2.10 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, C-5') 有兩個亞甲基訊號；在較低場域 δ_{H} 3.38 (2H, t, $J = 7.4$, C-2') 有一組亞甲基訊號，接有異原子； δ_{H} 2.77 (2H, t, $J = 7.4$, C-1') 為一接有苯環的亞甲基訊號。經由 ESI/MS 結果顯示，該異原子為氮；由碳譜顯示 (圖 51)，在高場域出現的烷基訊號為 δ_{C} 36.6 (C-1')、39.0 (C-2')、41.9 (C-5')、20.4 (C-6') 和 13.9 (C-7')；在低場域出現訊號為 δ_{C} 140.5 (C-1)、129.5 (C-2, 6)、127.3 (C-3, 5) 和 129.8 (C-4) 為一組苯環訊號；在低場域有一組吸收訊號 δ_{C} 176.1 (C-4')，為羰基的

訊號，與紅外光譜所得結果比對，可知在長側鏈部分有一個醯胺羰基；此外， δ_C 140.5 (C-1) 是一個四級碳，推測長側鏈在 36.5 (C-1') 與苯環的 δ_C 140.6 (C-1) 連接。與化合物 **7** 得到之結果比較，進一步與文獻比對，確認化合物 **8** 的結構為 2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide⁵⁶，是屬於已知物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 10。

表 10、¹H- and ¹³C-NMR data of **8** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H
1	140.5	
2	129.5	7.26 (1H, d, <i>J</i> = 7.3, 7.6 Hz)
3	129.8	7.17 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 7.6 Hz)
4	127.3	7.20 (1H, brs)
5	129.8	7.17 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 7.6 Hz)
6	129.5	7.26 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz)
1'	36.6	2.77 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz)
2'	41.9	3.38 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz)
4'	176.1	
5'	41.9	2.10 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz)
6'	20.4	1.59 (2H, m)
7'	13.9	0.89 (3H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz)

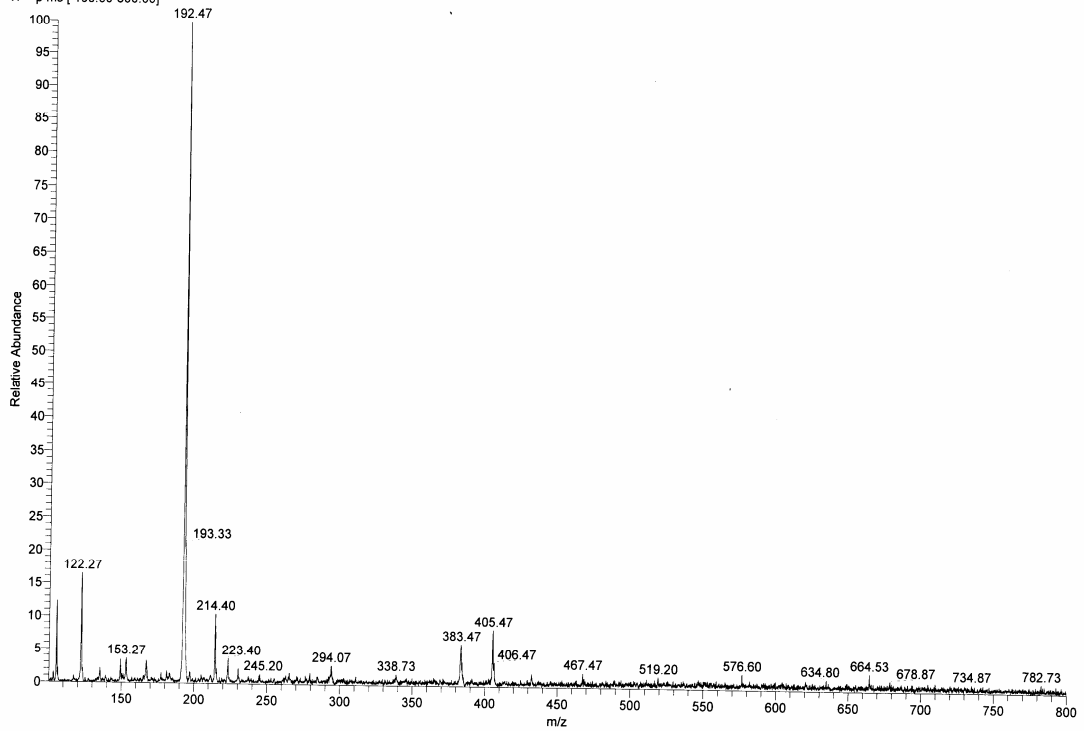
LYH1-60-2(+)_02 #1-29 RT: 0.00-0.69 AV: 29 NL: 1.97E5
T: + p ms [100.00-800.00]

圖 47、化合物 8 之電噴灑電離質譜。

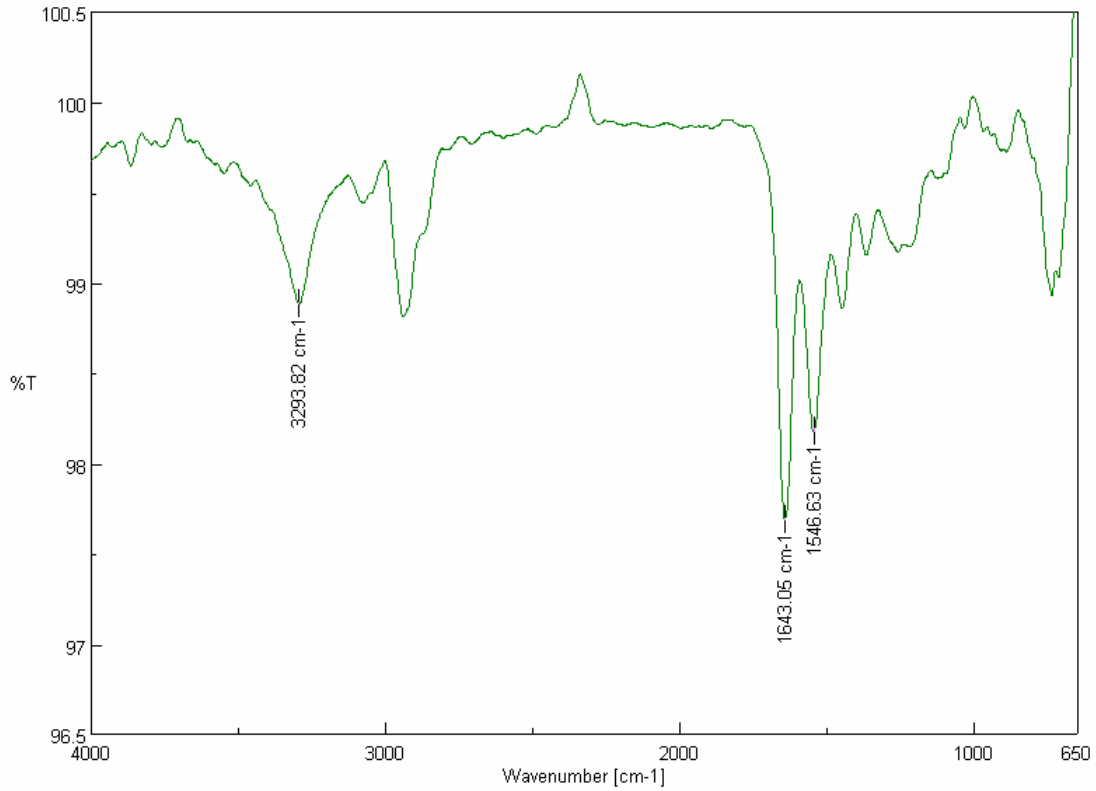


圖 48、化合物 8 之紅外光譜。

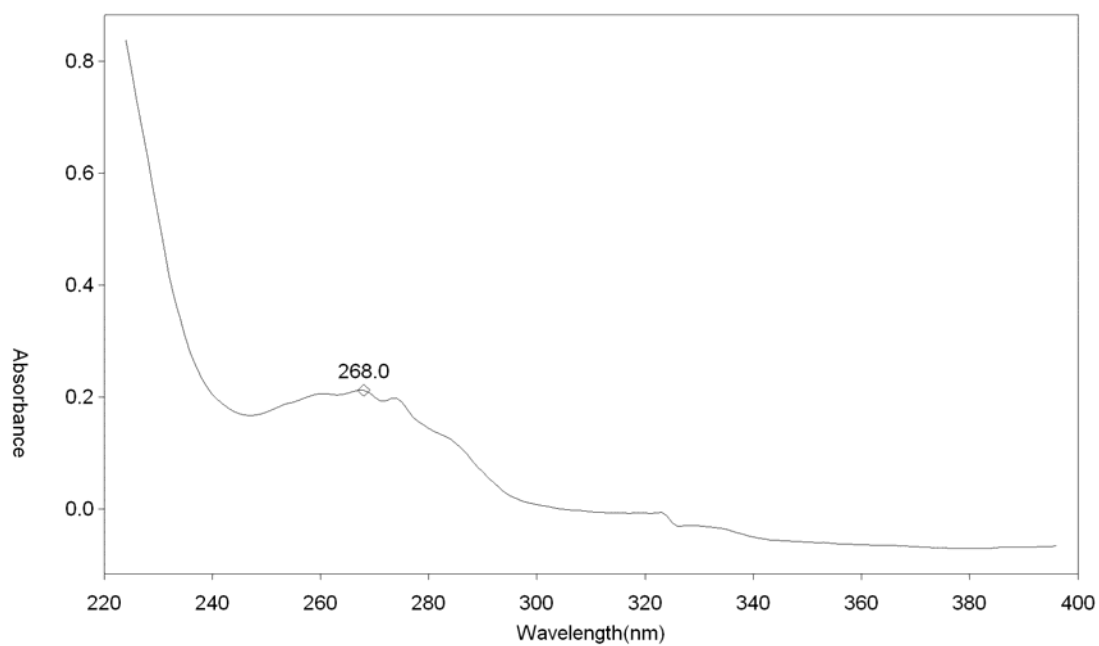


圖 49、化合物 8 之紫外光譜。

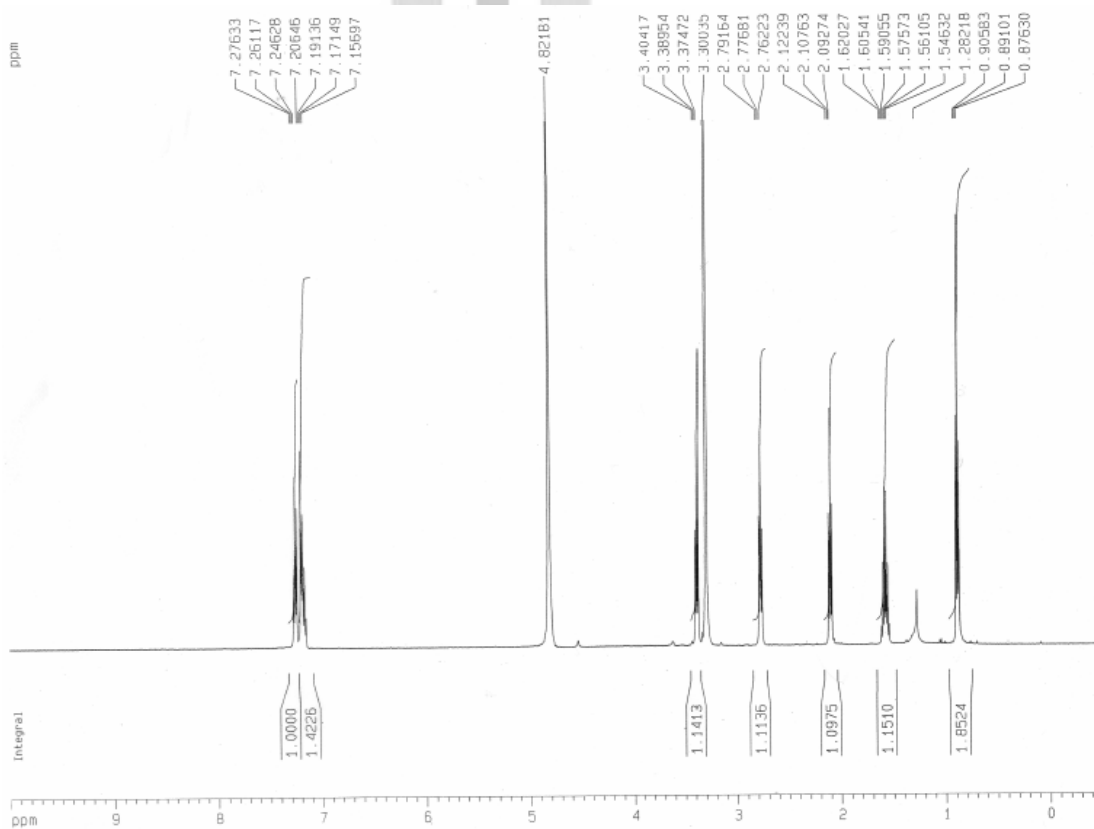


圖 50、化合物 8 之氫譜。

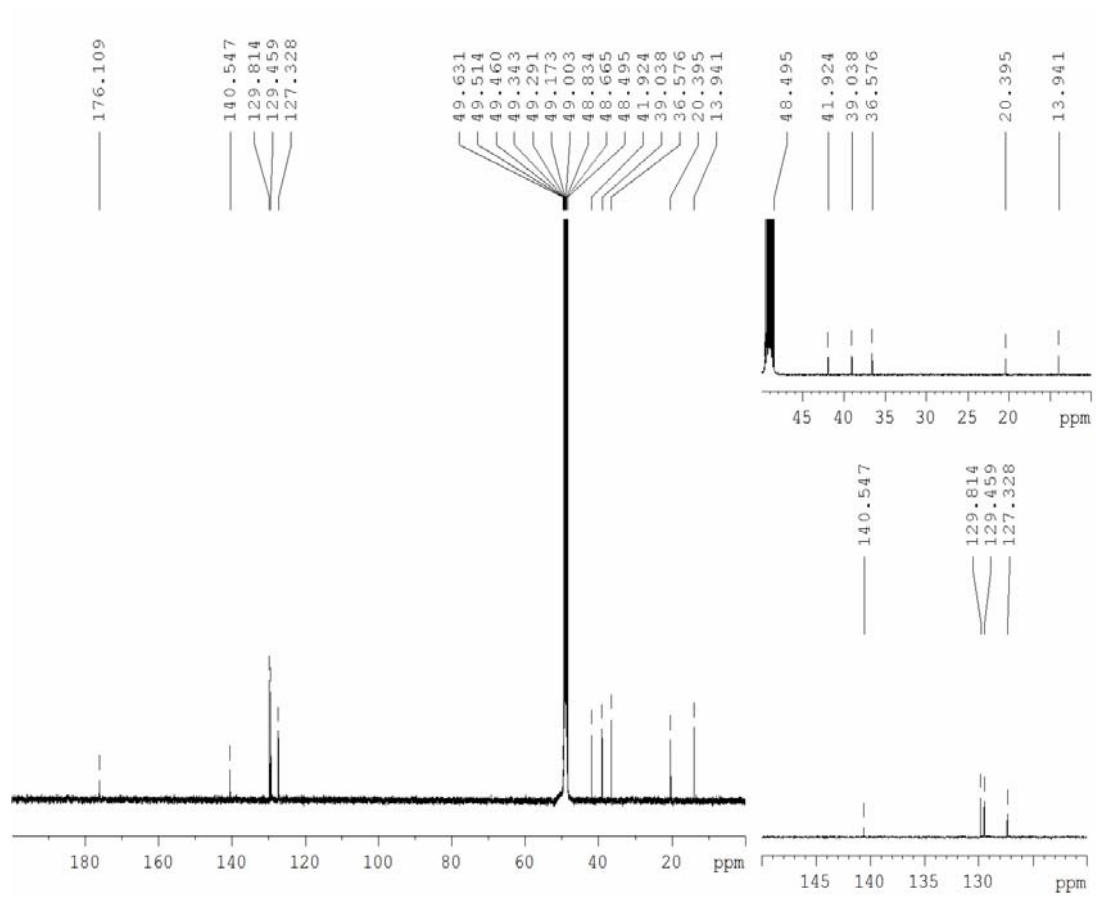
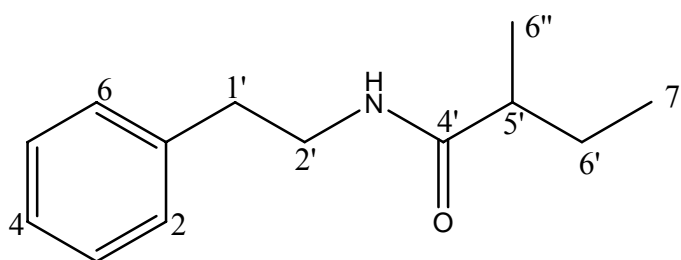


圖 51、化合物 8 之碳譜。

2.1.9 2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide (**9**) 之結構解析



化合物 **9** 為淡黃色粉狀無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +31.5^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 206 (圖 52)。由紅外光譜顯示有胺基 (3288 cm^{-1})、醯胺羰基 (1641 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 53)，紫外光譜在 258 nm 有最大吸收 (圖 54)。

化合物 **9** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) 顯示在芳香區中 (圖 55)，訊號分成兩區，在低場域部份顯示有 δ_{H} 7.26 (2H, dd, $J = 7.3, 7.5$ Hz, H-2, 6)、7.20 (1H, dd, $J = 7.3, 7.5$ Hz, H-4) 和 7.17 (2H, dd, $J = 7.3, 7.5$ Hz, H-3, 5) 所以推測為一個單取代的苯環；在高場域有兩組雙重峰訊號位於 δ_{H} 0.83 (3H, t, $J = 7.5$ Hz, H-7') 和 δ_{H} 1.04 (3H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6'')，推測有兩個末端甲基；在 δ_{H} 1.54 和 1.36 (each 1H, m, H₂-6') 有亞甲基訊號；在較低場域 δ_{H} 3.38 (2H, m, C-2') 有一組亞甲基訊號，應是接有異原子； δ_{H} 2.78 (2H, t, $J = 7.41$, C-1') 有一組亞甲基訊號，推測接有苯環。經由 ESI/MS 結果顯示化合物之分子量為奇數，推測該異原子為氮，與紅外光譜所得結果吻合。與化合物 **7** 得到之結果比較，進一步與文獻比對，確認化合物 **9** 的結構為

2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide⁵⁵，是屬於已知物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 11。

表 11、¹H- and ¹³C-NMR data of **9** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹ H
1	
2	7.26 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 7.5 Hz)
3	7.17 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 7.5 Hz)
4	7.20 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 7.5 Hz)
5	7.17 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 7.5 Hz)
6	7.26 (1H, dd, <i>J</i> = 7.3, 7.5 Hz)
1'	2.78 (2H, t, <i>J</i> = 7.4 Hz)
2'	3.38 (2H, m)
4'	
5'	2.78(1H, m)
6'	1.54 (1H, m)
	1.36 (1H, m)
6''	1.04 (3H,d, <i>J</i> = 7.5 Hz)
7'	0.83 (3H, t, <i>J</i> = 7.5 Hz)

LYH1-60-4(+)#1-32 RT: 0.02-0.60 AV: 32 NL: 8.73E5
T: + p ms [100.00-800.00]

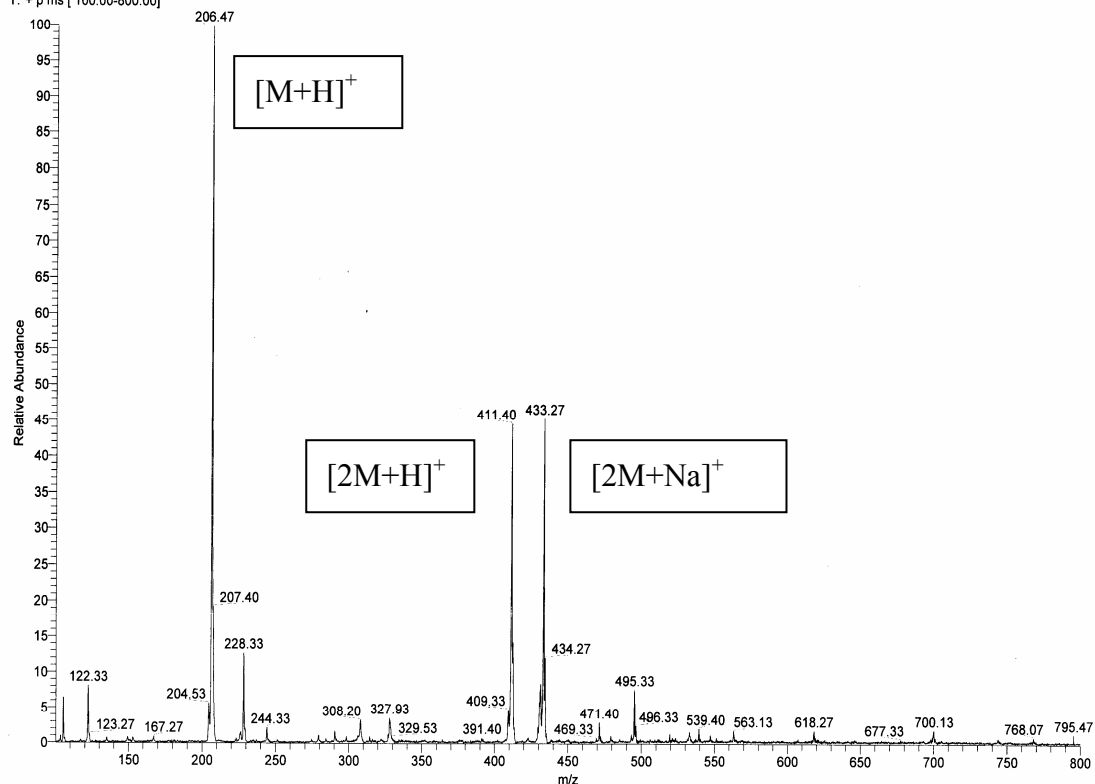


圖 52、化合物 9 之電噴灑電離質譜。

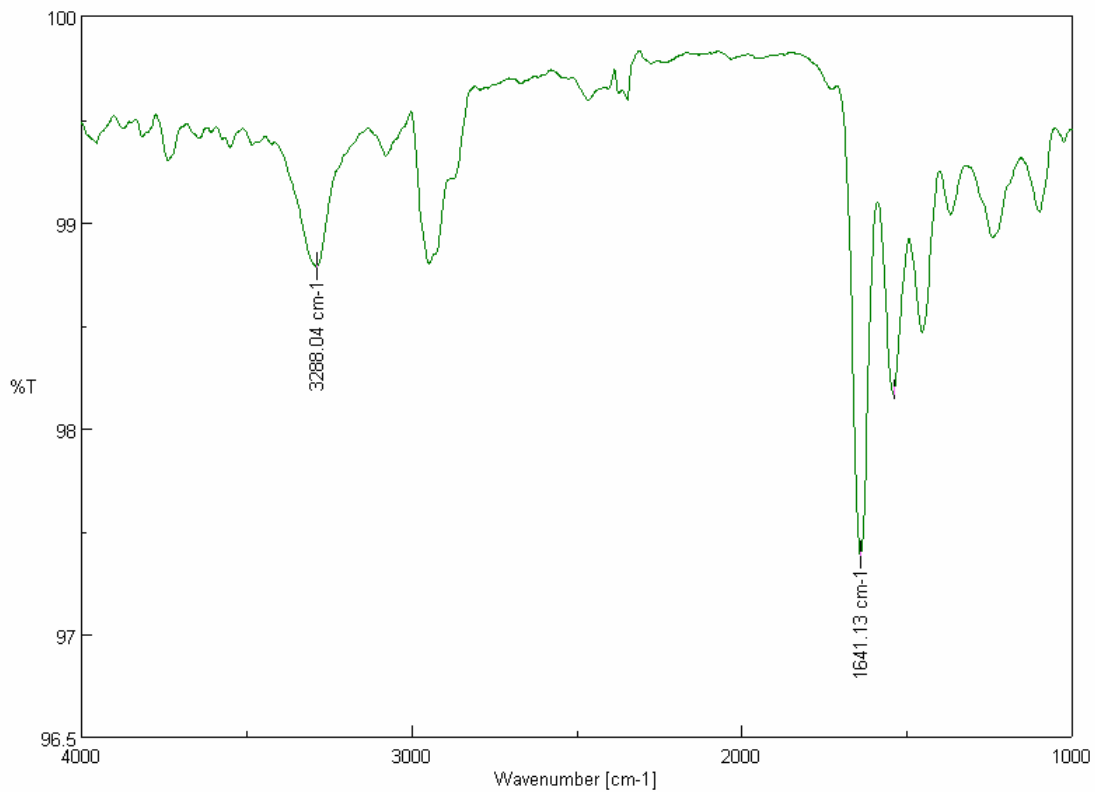


圖 53、化合物 9 之紅外光譜。

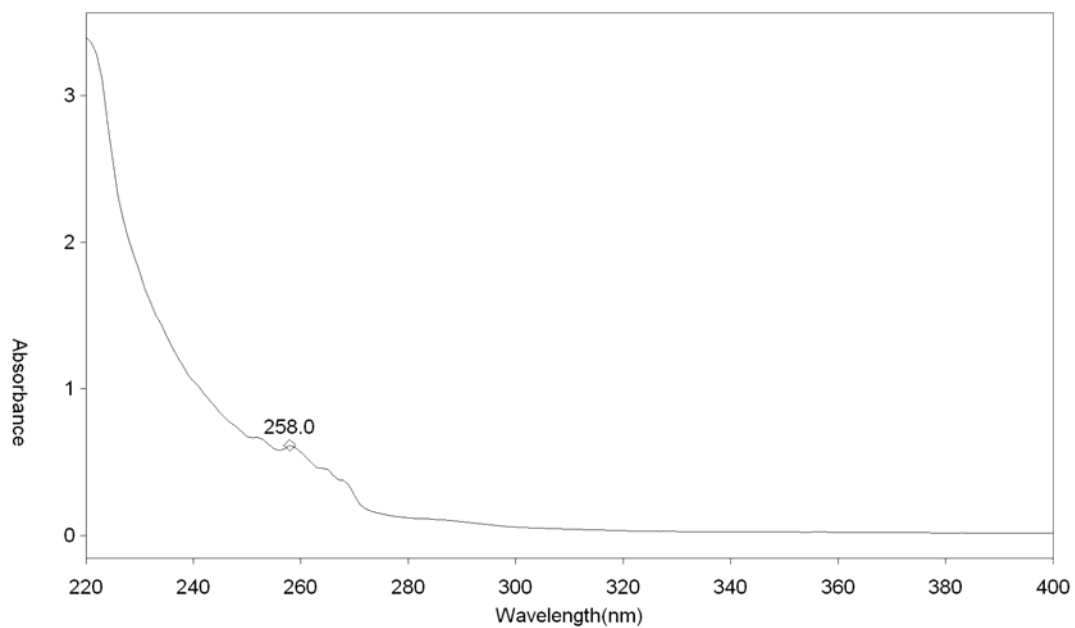


圖 54、化合物 9 之紫外光譜。

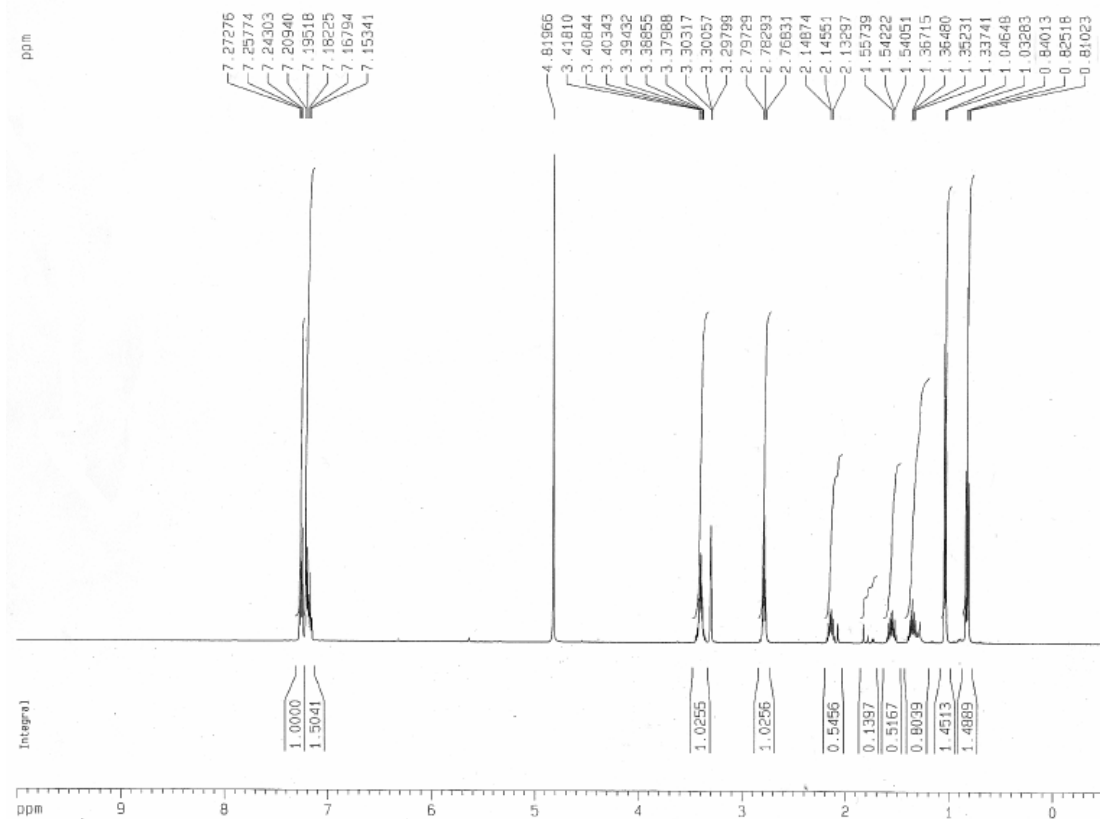
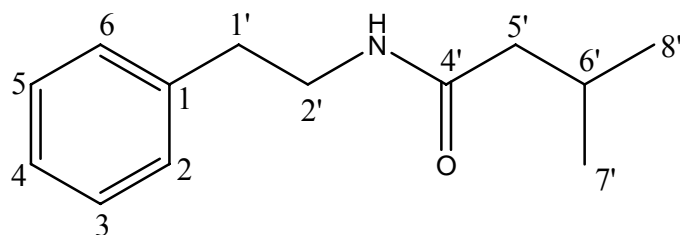


圖 55、化合物 9 之氫譜。

2.1.10 *N*-(2'-phenylethyl)isovaleramide (**10**) 之結構解析



化合物 **10** 為無色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} + 27.8^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 206 (圖 56)。紅外光譜顯示有胺基 (3303 cm^{-1}) 和醯胺羰基 (1622 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 57)，紫外光譜在 251 nm 有最大吸收 (圖 58)。

化合物 **10** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz)(圖 59) 顯示在芳香區中，有 δ_H 7.29 (2H, m, H-2, 6)、7.20 (1H, m, H-4) 和 7.12 (2H, m, H-3, 5) 等吸收訊號，為一單取代苯環；在高場域有一組雙重峰訊號位於 δ_H 0.92 (6H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-7', 8')，為兩個末端甲基；在 δ_H 1.98 (2H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-5') 有一組二重峰訊號，為一個亞甲基；在 δ_H 2.82 (2H, t, $J = 6.8\text{ Hz}$, H-1') 有一組三重峰訊號，為連接一個苯環的亞甲基；在較低場域 δ_H 3.51 (2H, t, $J = 6.8\text{ Hz}$, H-2') 有一組吸收訊號，為接有異原子的亞甲基，由 ESI/MS 結果顯示化合物 **10** 之分子量為奇數，推測該異原子為氮；由碳譜 (CD_3OD , 125 MHz) 顯示 (圖 60)， δ_C 138.9 (C-1)、128.6 (C-2, -6)、128.7 (C-3, 5) 和 126.5 (C-4) 為一組苯環訊號，進一步檢視 HSQC 實驗所得的結果，確認 δ_C 138.9 (C-1) 是一個四級碳；在低場域有一組吸收訊號 δ_C 172.4 (C-4')，為羰基的訊號。在 COSY 實驗中指

出 (圖 61), δ_{H} 0.92 (H₃-7', 8') 與 δ_{H} 2.06 (H-6') 相關, 且 δ_{H} 1.96 (H₂-5') 與 δ_{H} 2.06 (H-6') 相關, 形成了一個異丁基 (isobutyl group); δ_{H} 2.82 (H₂-1') 與 δ_{H} 3.38 (H₂-2') 相關。由 HMBC 實驗 (圖 62) 得知, δ_{H} 0.92 (H₃-7', 8') 與 δ_{C} 26.1 (C-6') 及 46.2 (C-5') 相關; δ_{H} 2.06 (H-6') 與 δ_{C} 22.4 (C-7', 8') 及 46.2 (C-5') 相關; δ_{H} 1.96 (H-5') 與 δ_{C} 172.4 (C-4')、26.1 (C-6') 及 22.4 (C-7', 8') 相關, 推測 δ_{H} 1.96 (H-5') 旁邊接有醯胺羰基; δ_{H} 3.51 (H₂-2') 與 δ_{C} 138.9 (C-1)、172.4 (C-4') 及 35.8 (C-1') 相關, 由此得知 C-1' ~ C-8' 為一組長側鏈; δ_{H} 2.82 (H₂-1') 與 δ_{C} 138.9 (C-1) 及 40.4 (C-2') 相關, 此長側鏈在 35.8 (C-1') 與苯環的 δ_{C} 138.9 (C-1) 連接。綜合以上解析並與文獻做比對, 確認化合物 **10** 的結構為 *N*-(2'-phenylethyl)isovaleramide⁵⁵, 是屬於已知物。以上解析所得之數據詳列於表 12。

表 12、 ^1H - and ^{13}C -NMR data of **10** (CD_3OD , 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C)

No.	^{13}C	^1H	HMBC (H→C)	COSY
1	138.9			
2	128.6	7.29 (1H, m)	1, 3, 5	3
3	128.7	7.12 (1H, m)	2, 4, 5	2, 4
4	126.5	7.20 (1H, m)	2, 6	3, 5
5	128.7	7.12 (1H, m)	3, 4, 6	4, 6
6	128.6	7.29 (1H, m)	1, 2, 5	5
1'	35.8	2.82 (2H, t, $J = 6.8$ Hz)	1, 2, 6, 2'	2'
2'	40.4	3.51 (2H, t, $J = 6.8$ Hz)	1, 1', 4'	1'
4'	172.4			
5'	46.2	1.98 (2H, d, $J = 7.0$ Hz)	4', 6', 7', 8'	6'
6'	26.1	2.06 (1H, m)	5', 7', 8'	5', 7', 8'
7'	22.4	0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	5', 6', 8'	6'
8'	22.4	0.92 (3H, d, $J = 7.0$ Hz)	5', 6', 7'	6'

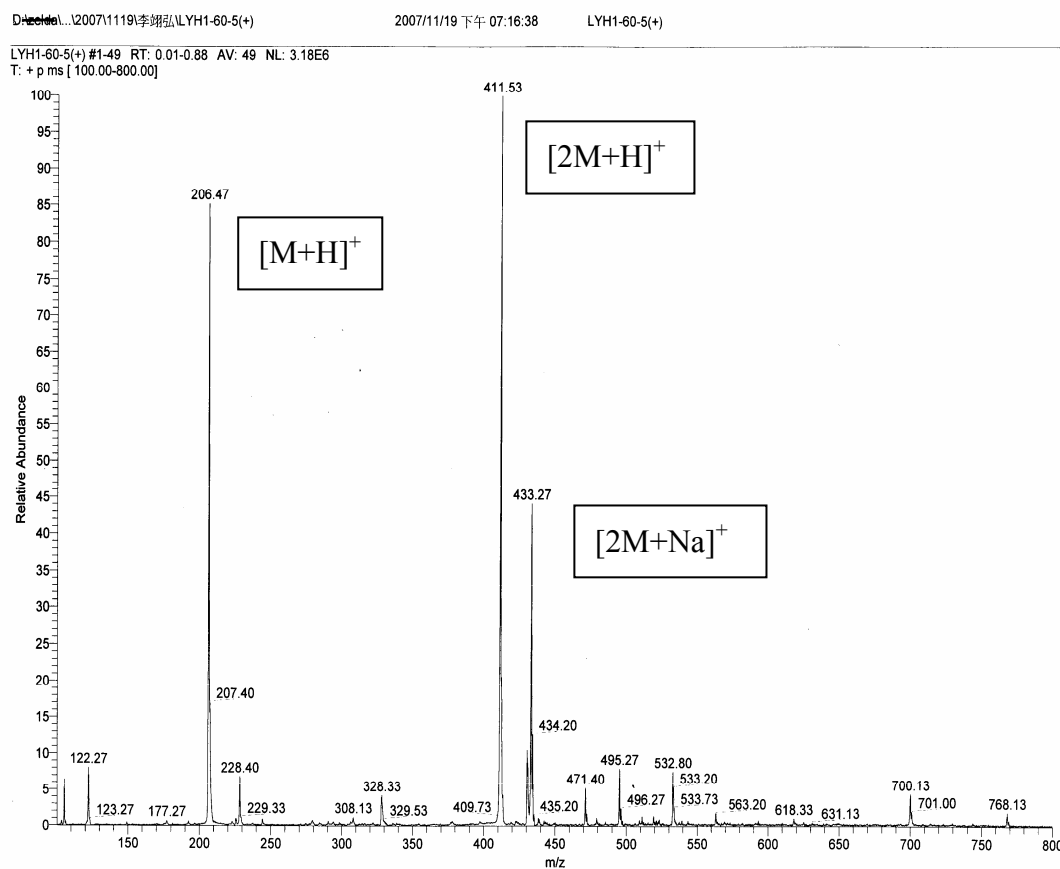


圖 56、化合物 **10** 之電噴灑電離質譜。

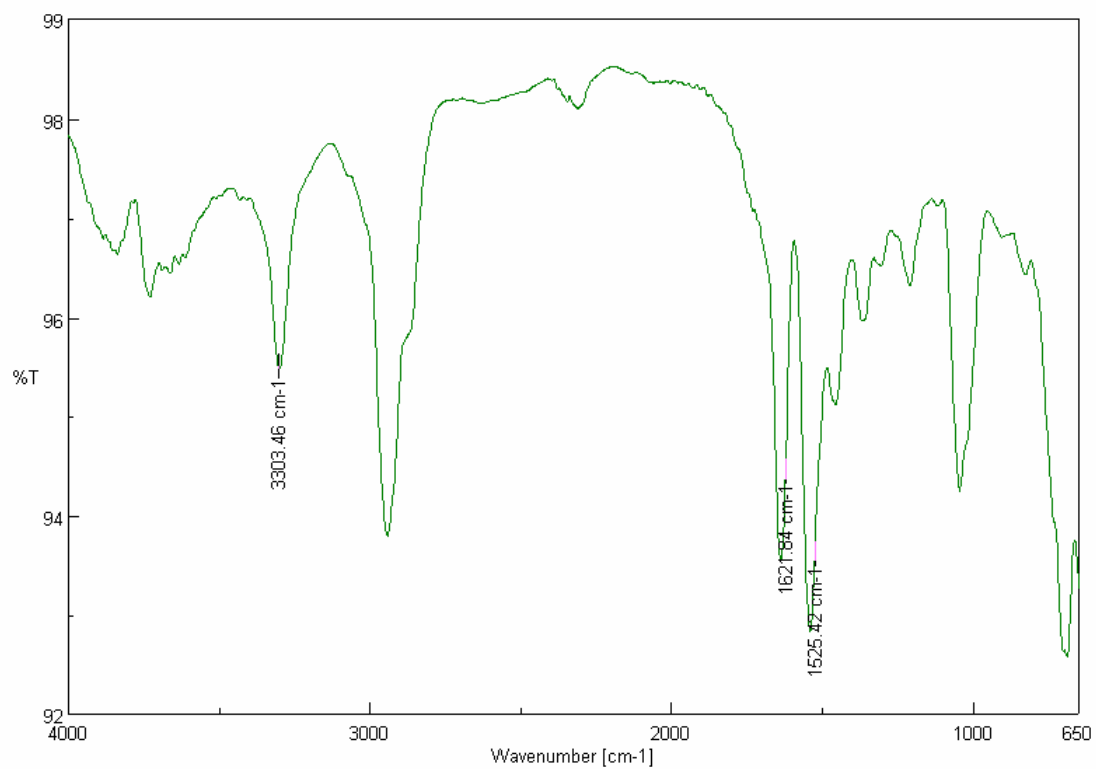


圖 57、化合物 **10** 之紅外光譜。

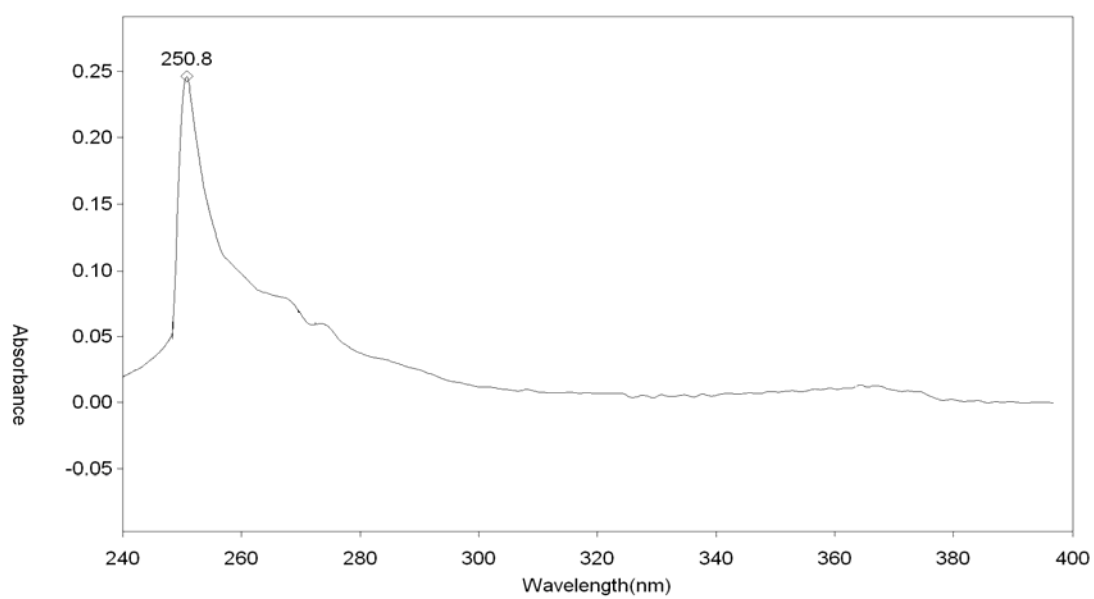


圖 58、化合物 **10** 之紫外光譜。

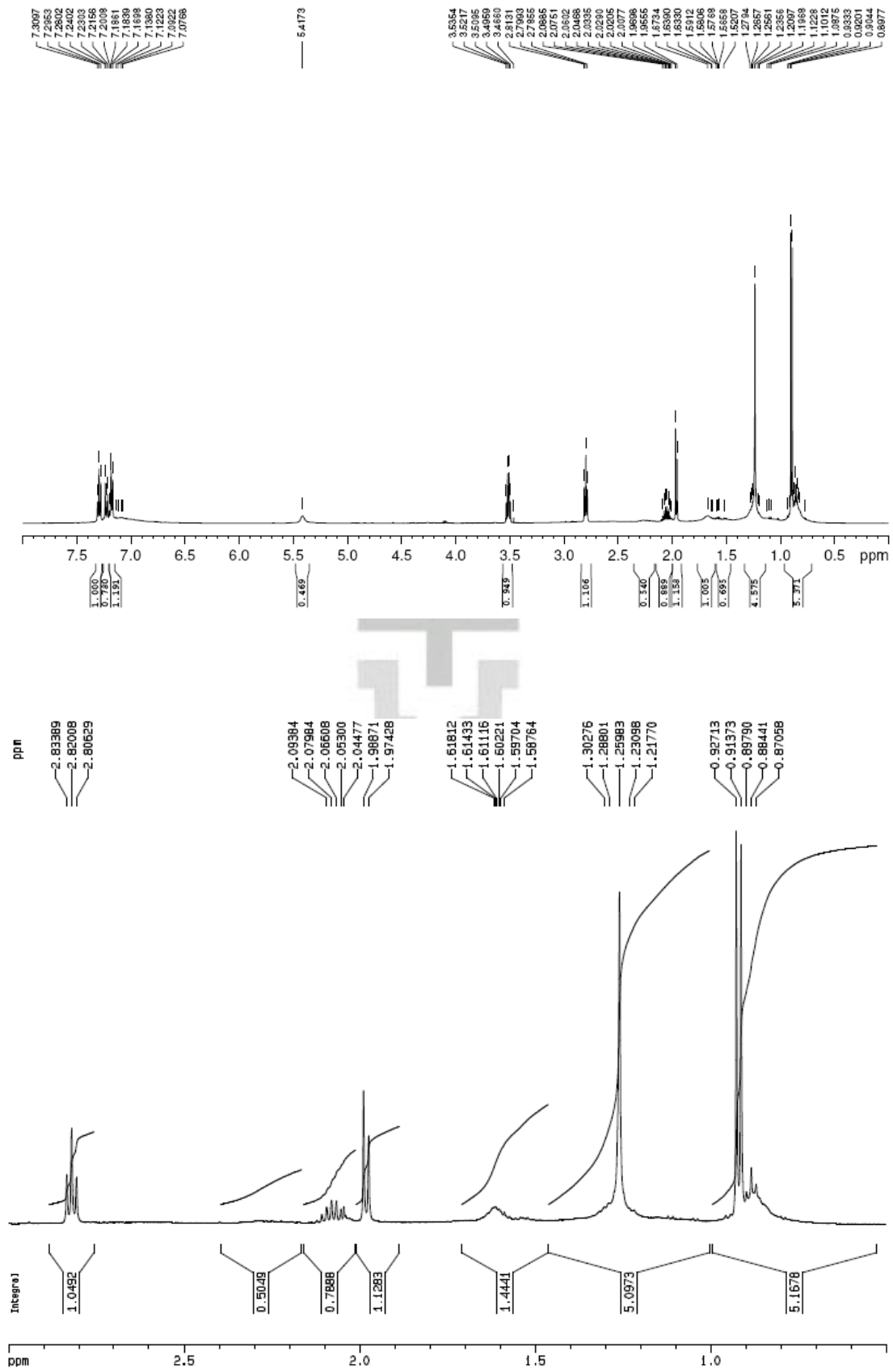


圖 59、化合物 10 之氫譜。

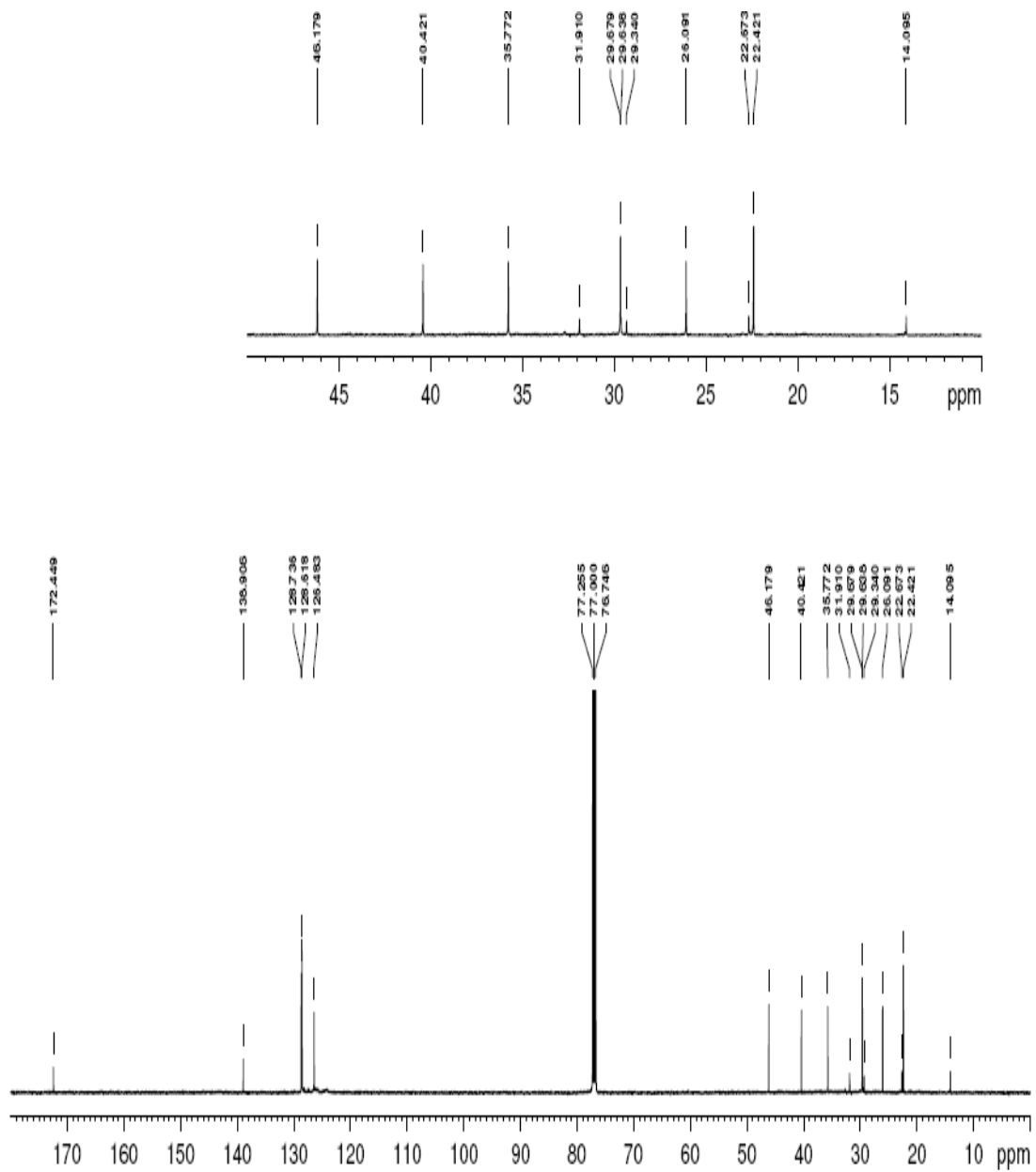


圖 60、化合物 10 之碳譜。

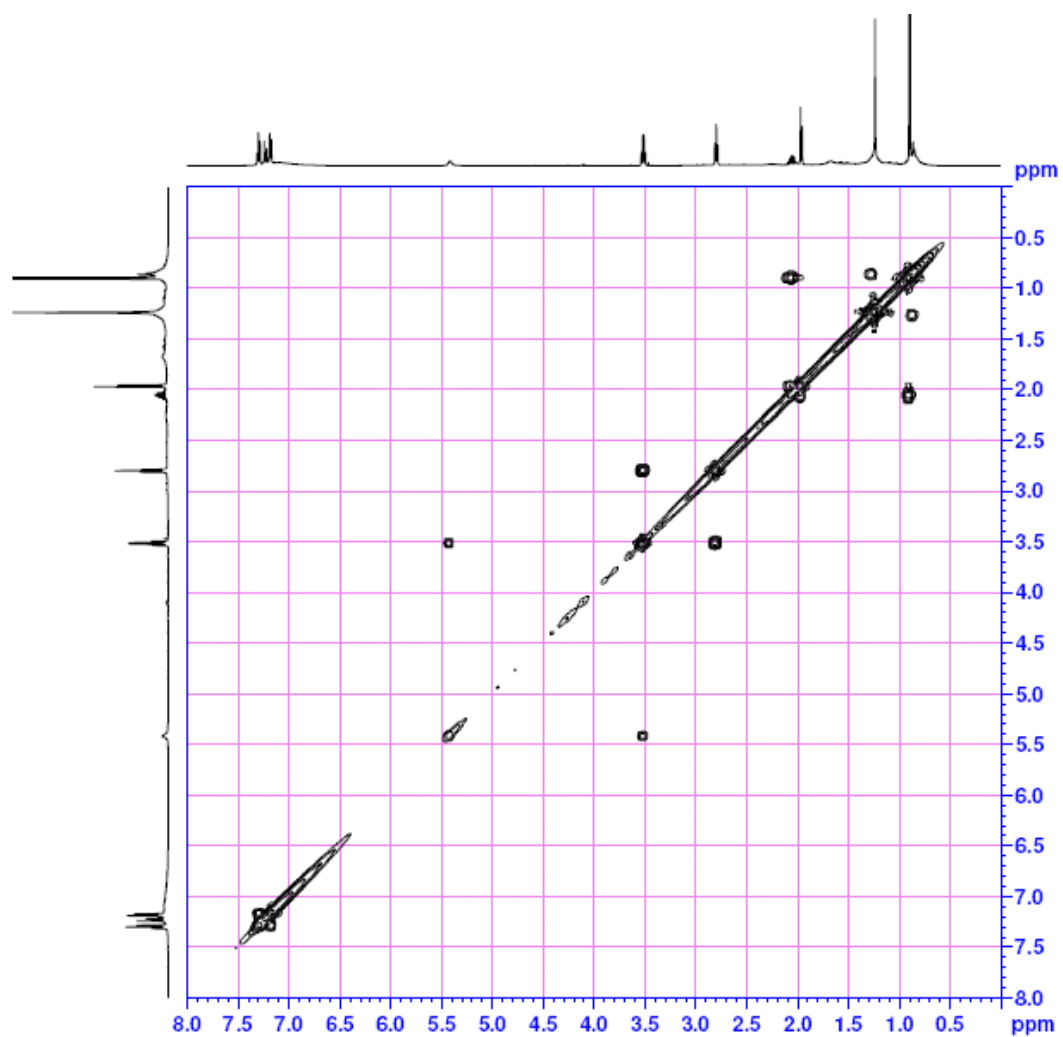
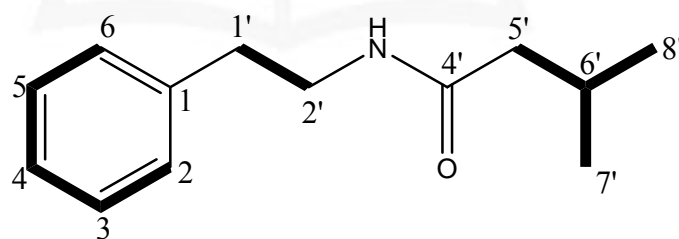


圖 61、化合物 **10** 之 COSY 圖譜。



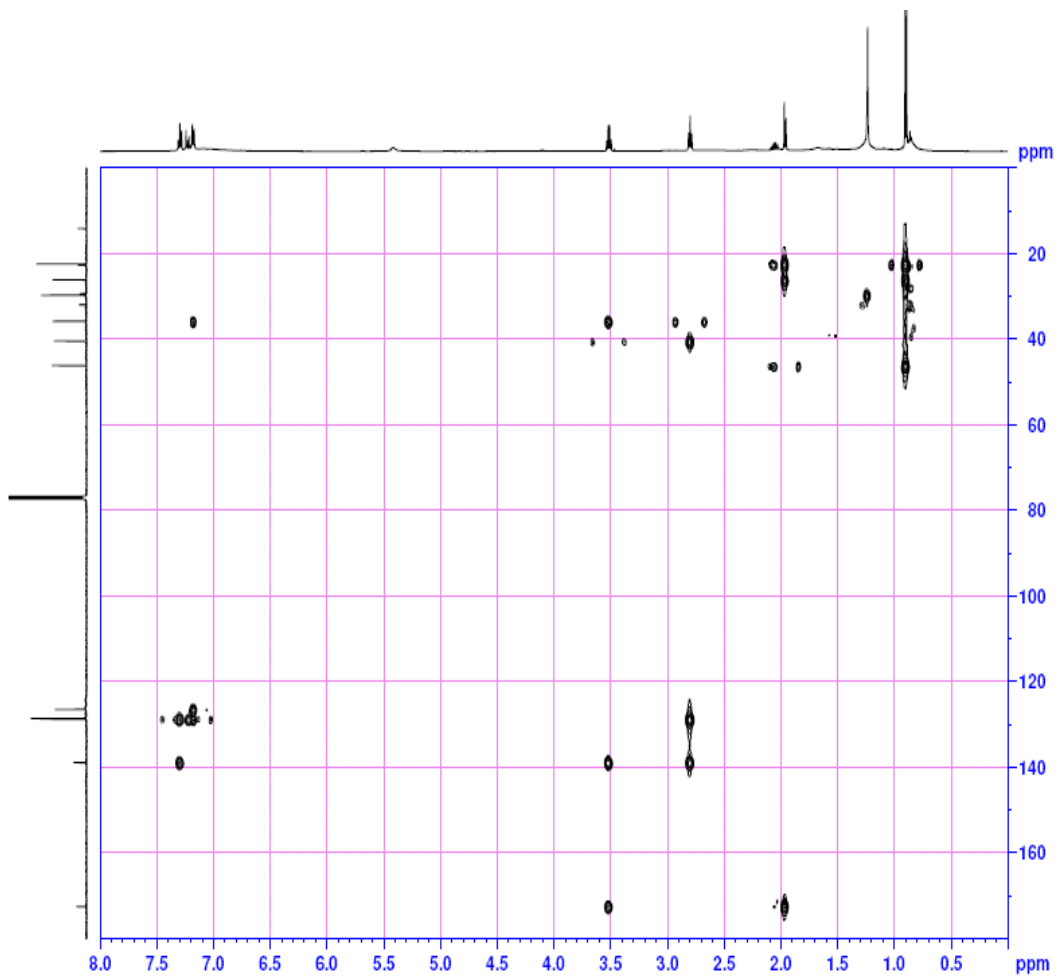
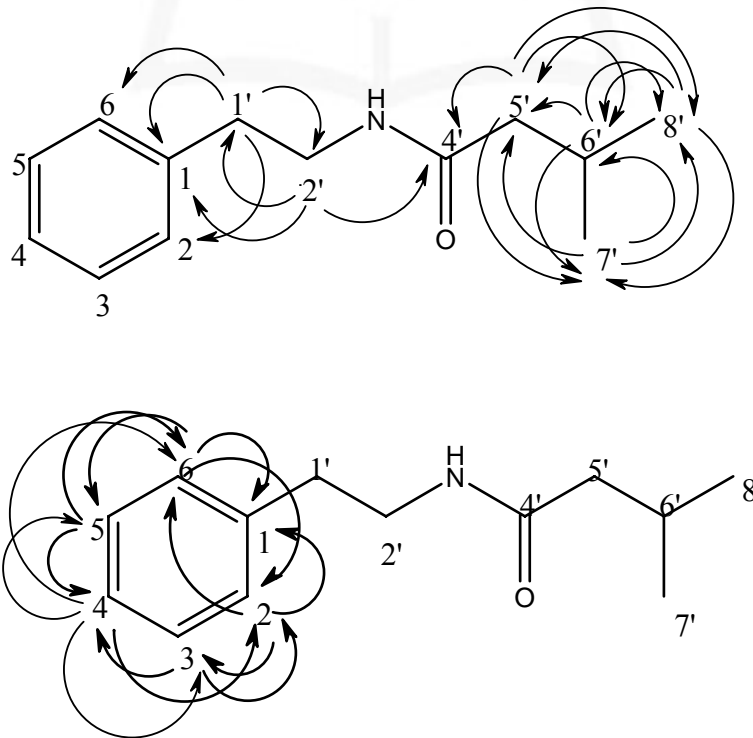
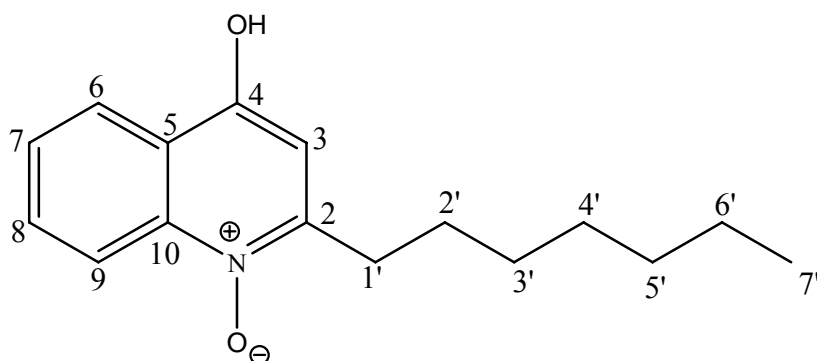


圖 62、化合物 10 之 HMBC 圖譜。



2.1.11 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (**11**) 之結構解析



化合物 **11** 為無色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} +12.3^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 261 (圖 63)。由紅外光譜顯示有烴基 (3302 cm^{-1}) 和苯環 (1504 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 64)，紫外光譜在 240 nm 和 328 nm 有最大吸收 (圖 65)。

化合物 **11** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) 顯示在芳香區中 (圖 66)，有 δ_{H} 7.48 (1H, dd, $J = 8.0, 7.5\text{ Hz}$, H-8)、7.78 (1H, dd, $J = 8.0, 7.5\text{ Hz}$, H-7)、8.07 (1H, d, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-9)、8.24 (1H, d, $J = 8.0\text{ Hz}$, H-6) 等四組訊號，為一個鄰位雙取代的苯環；一組三取代雙鍵的質子訊號位於 δ_{H} 6.28 (1H, br s, H-3)；一組三重峰訊號位於 δ_{H} 0.86 (3H, t, H₃-7')，為一末端甲基；在 δ_{H} 1.30 ~ 1.45 (8H, m, H₂-3' ~ 6') 有 8 個氫的吸收訊號；在較低場域有 δ_{H} 1.75 (2H, br t, $J = 7.5\text{ Hz}$, H₂-2') 及 2.89 (2H, br t, $J = 7.5\text{ Hz}$, H₂-1') 的訊號吸收，與化合物 **1** 做比對，其分裂形式相同，推測 H₂-1' ~ H₃-7' 為一長脂肪鏈。由碳譜 (圖 67) 得知 δ_{C} 156.4 (C-4) 為接有異原子的不飽和碳，而根據 ESI/MS 所推測之分子量，與紅外光譜實驗數據作比對，顯示有烴基與亞硝基存在，故推測此異原子為氧

原子。此外，在高場域出現的飽和碳訊號為 δ_C 33.0、32.6、30.1、30.4、28.6、23.7 和 14.4；在低場域出現的 δ_C 142.0 (C-2) 和 δ_C 133.6 (C-10) 兩個訊號，為接有異原子的不飽和碳。此外，由碳譜得知， δ_C 116.9 (C-9)、125.9 (C-7)、125.8 (C-6)、125.4 (C-5)、133.6 (C-8) 和 133.6 (C-10) 為一組苯環的訊號。綜合以上解析所得之數據詳列於表 13，並與文獻比對後確認化合物 **11** 為已知物 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide^{53, 57}。綜合以上解析所得之數據詳列於表 13。



表 13、 ^1H - and ^{13}C -NMR data of **11** (CD_3OD , 500 MHz for ^1H and 125 MHz for ^{13}C)

No.	^{13}C	^1H
2	141.2	
3	107.5	6.28 (1H, br s)
4	156.4	
5	125.4	
6	125.8	8.24 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
7	125.9	7.78 (1H, dd, $J = 8.0, 7.5$ Hz)
8	133.6	7.48 (1H, dd, $J = 8.0, 7.5$ Hz)
9	116.9	8.07 (1H, d, $J = 8.0$ Hz)
10	133.6	
1'	33.0	2.89 (2H, br t, $J = 7.5$ Hz)
2'	32.6	1.75 (2H, br t, $J = 7.5$ Hz)
3'	30.1	1.30~1.45 (2H, m)
4'	30.4	1.30~1.45 (2H, m)
5'	28.6	1.30~1.45 (2H, m)
6'	23.7	1.30~1.45 (2H, m)
7'	14.4	0.86 (3H, t, $J = 6.8$ Hz)

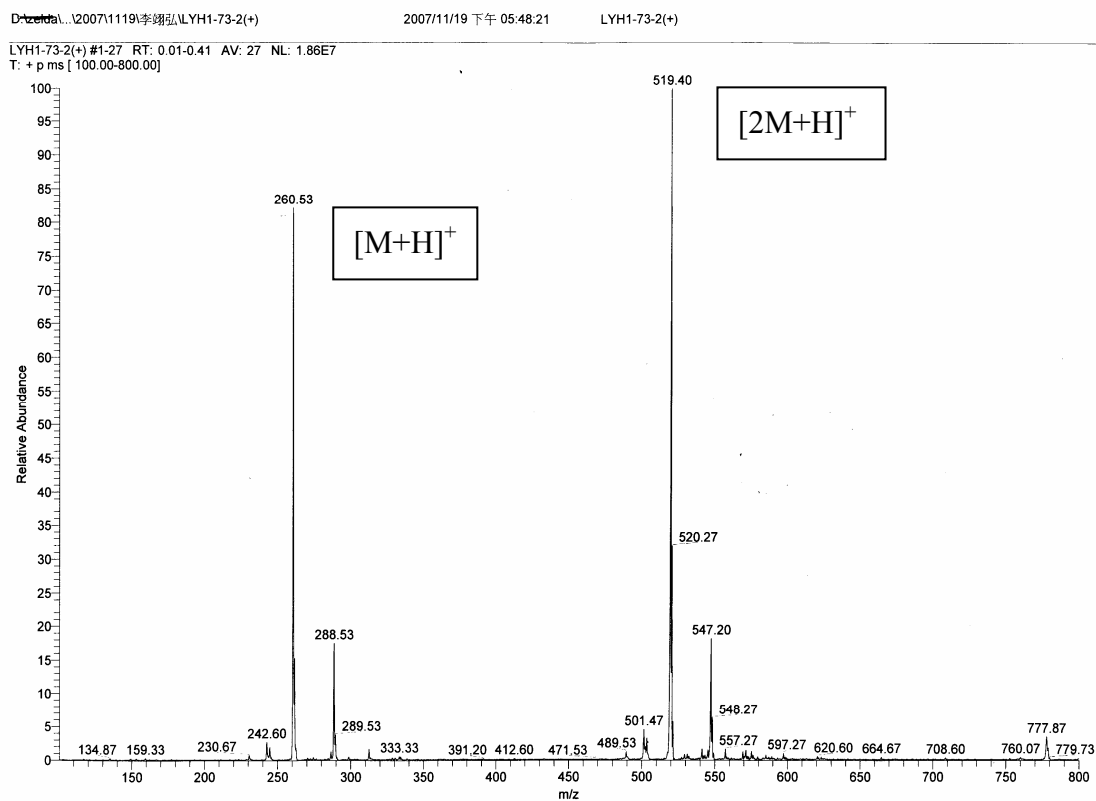


圖 63、化合物 **11** 之電噴灑電離質譜。

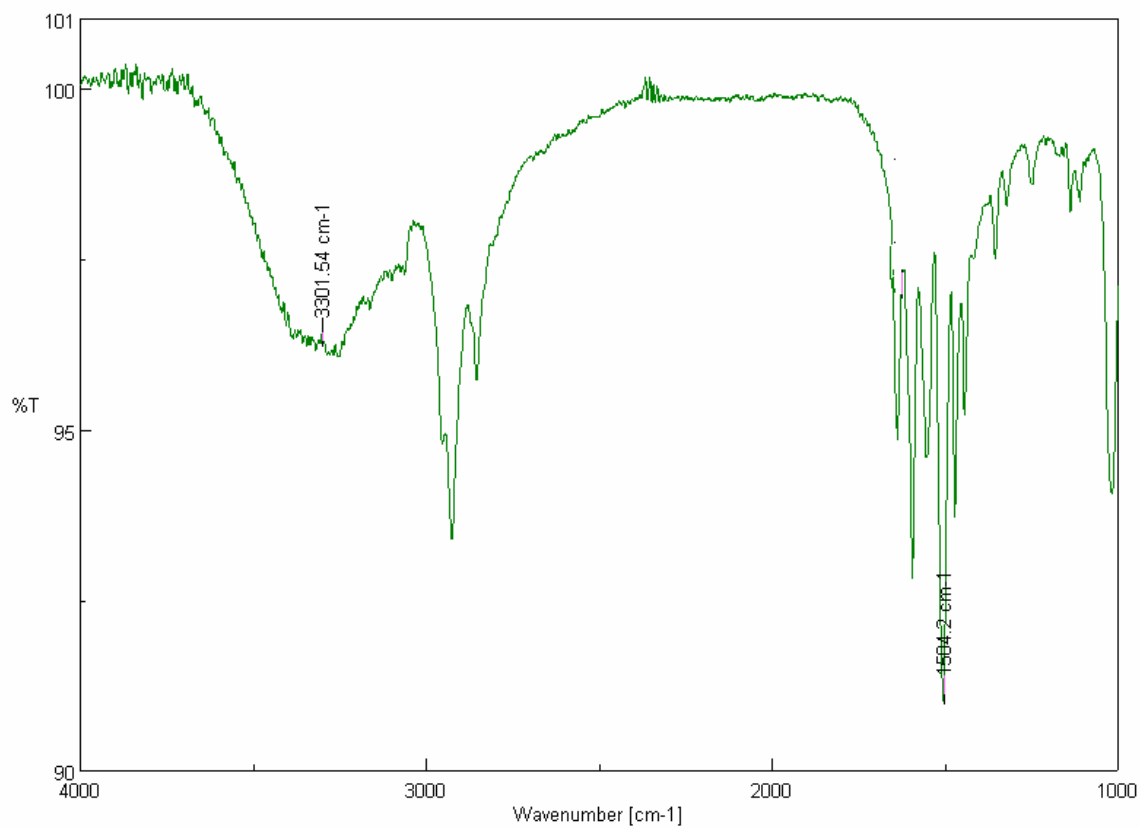


圖 64、化合物 **11** 之紅外光譜。

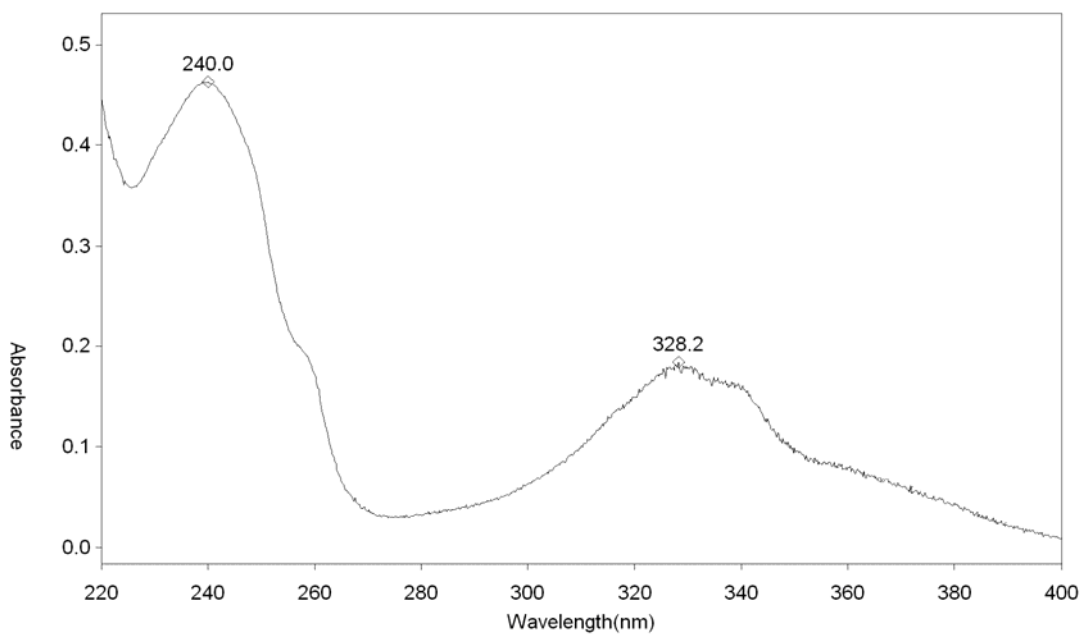


圖 65、化合物 **11** 之紫外光譜。

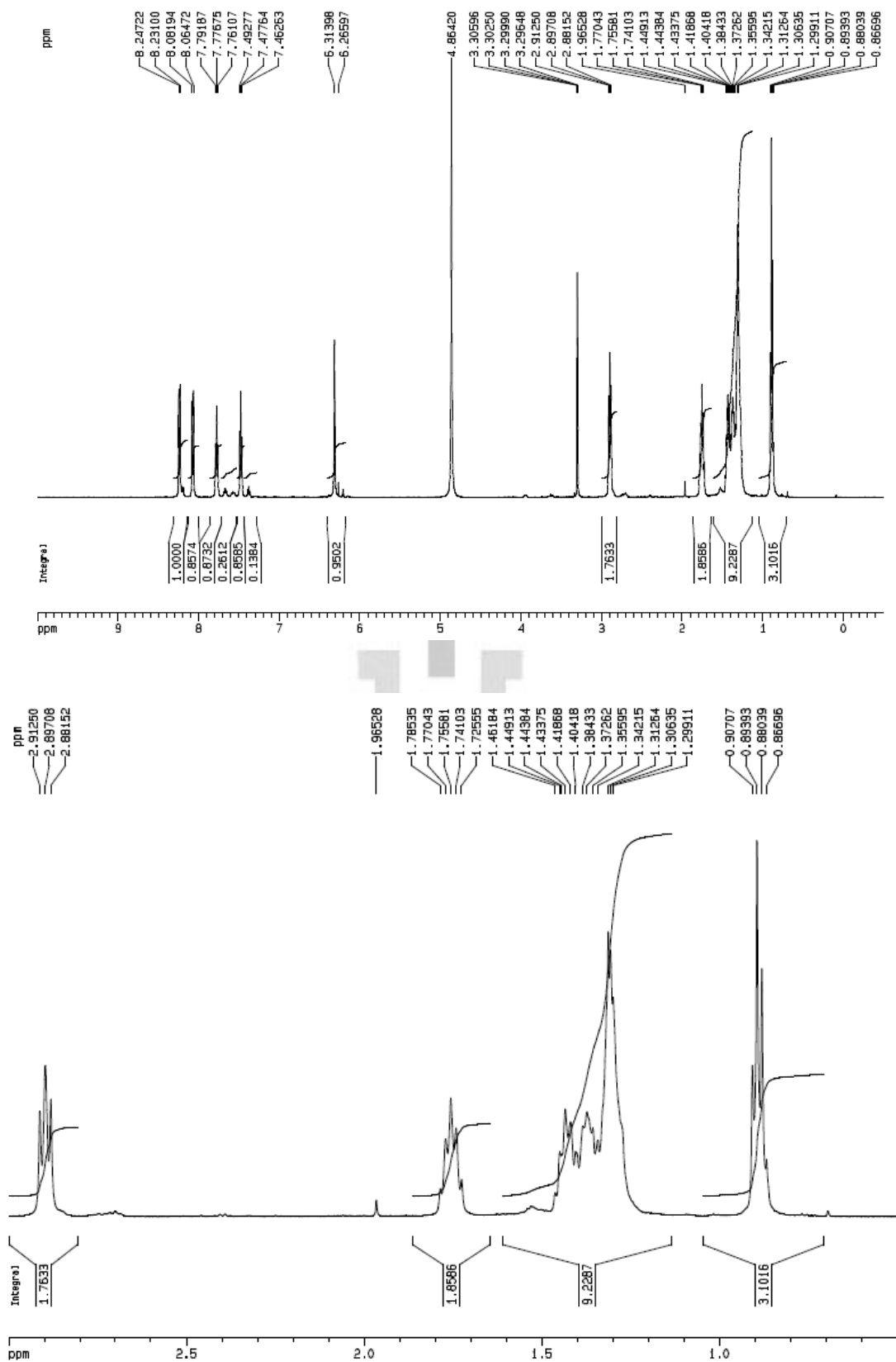


圖 66、化合物 11 之氫譜。

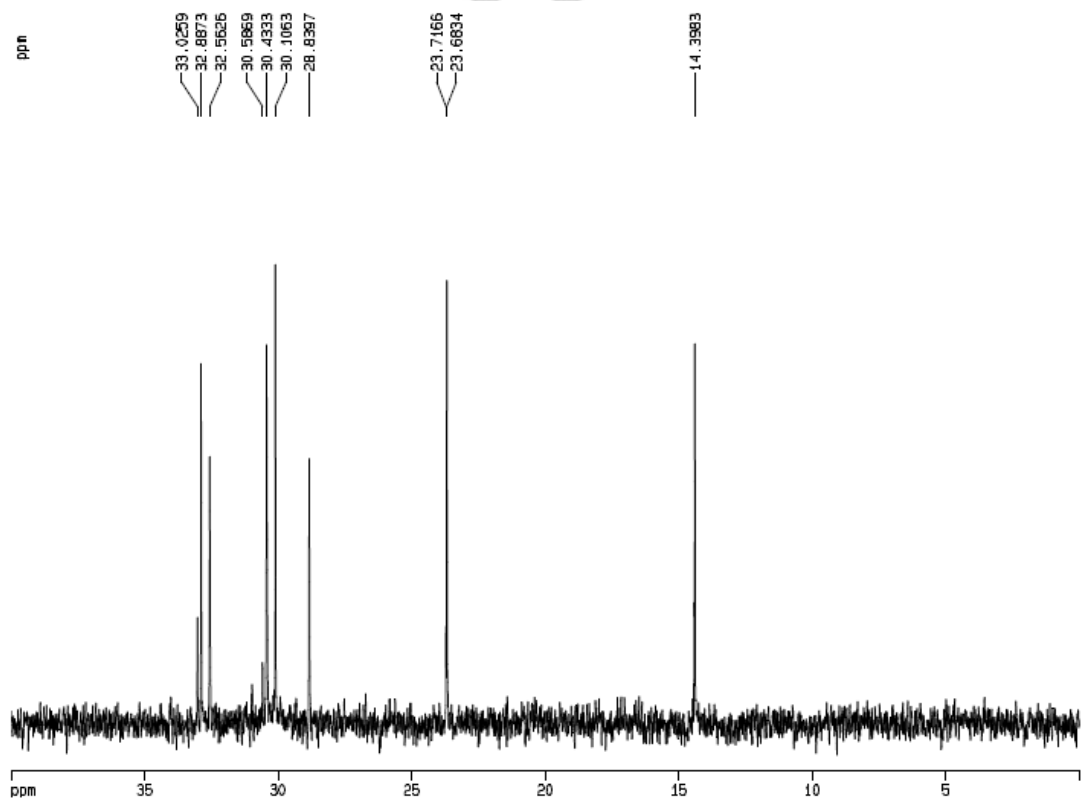
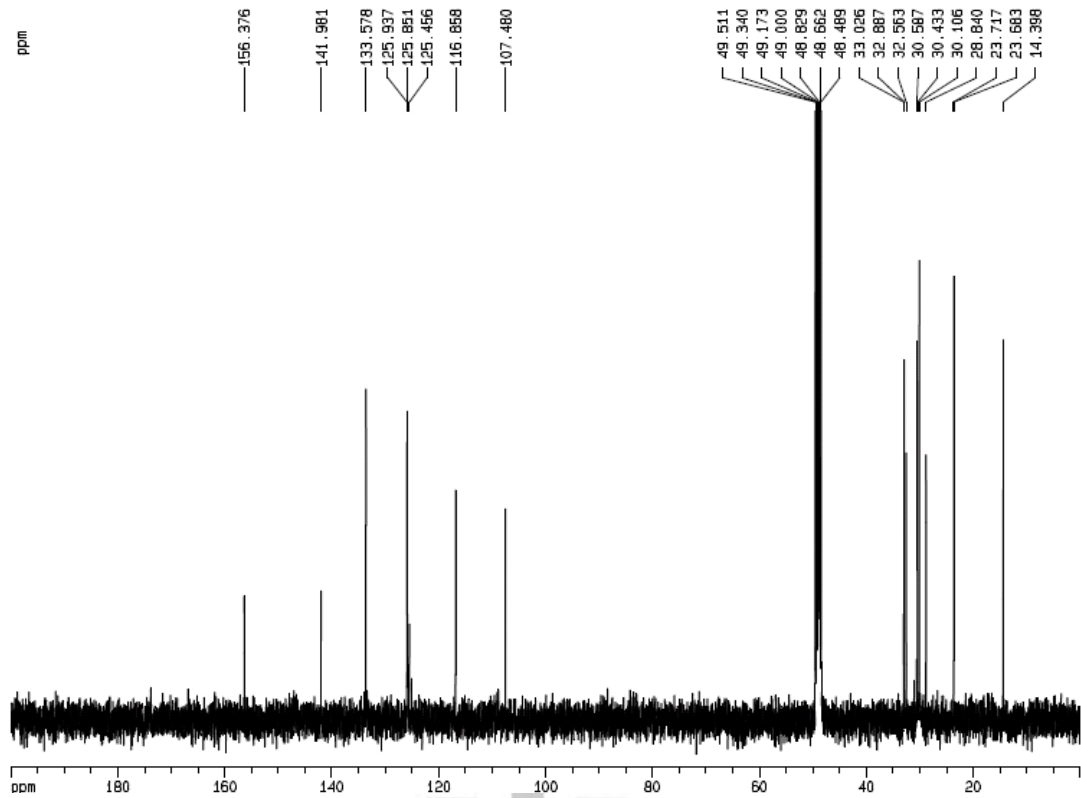
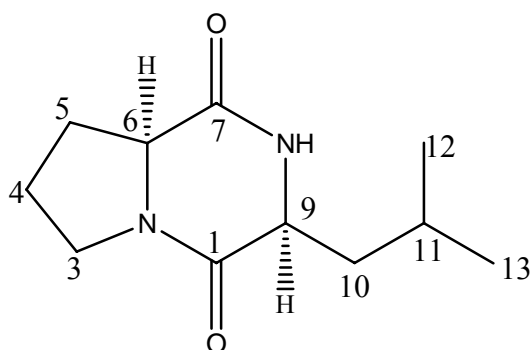


圖 67、化合物 **11** 之碳譜。

2.1.12 cyclo-L-Pro-L- Leu (**12**) 之結構解析



化合物 **12** 為白色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} -42.8^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 211 (圖 68)。由紅外光譜顯示有胺基 (3266 cm^{-1}) 和醯胺羰基 (1634 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 69)。

化合物 **12** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) (圖 70) 顯示，有一個較高場的訊號位於 δ_{H} 1.05 (6H, d, $J = 7.3\text{ Hz}$, H_3 -12, 13)，推測有兩個末端甲基存在；有一個次甲基訊號存在於 1.90 (1H, m, H-11)；在 δ_{H} 4.11 (1H, t, $J = 5.2\text{ Hz}$, H-6)、4.19 (1H, t, $J = 7.7\text{ Hz}$, H-9) 和 3.50 (2H, m, H-3) 為接有異原子的訊號，其中 H-6 和 H-9 旁邊接有其它拉電子基，使得訊號在更低場域的地方出現。此外，尚有三個亞甲基，分別位於 δ_{H} 1.90 (2H, m, H_2 -4)、1.90 (1H, m, H_a -5) 和 2.28 (1H, d, $J = 5.4\text{ Hz}$, H_b -5)、 δ_{H} 1.51 和 1.90 (each 1H, m, H_2 -10)。由碳譜 (圖 71) 可知，有兩個羰基的吸收訊號分別在 δ_{C} 168.9 (C-7) 和 δ_{C} 172.8 (C-1)，另兩個位於較高場域的訊號在 δ_{C} 22.2 (C-12) 和 δ_{C} 23.3 (C-13)，與氫譜訊號聯結得知其分裂型式，進一步與化合物 **3** 比對後，發現其訊號的分裂型式相似，僅在側鏈部分不同。尚有紅外線光譜的佐證含有醯胺基，故

推測此化合物平面結構為 cyclo-Pro-Leu，且具有兩個立體中心。利用鹽酸水解為兩個單胺基酸，使用可分析胺基酸鏡相異構物的 HPLC 管柱，再分別與標準品的滯留時間做對照，證實化合物 12 所含兩個胺基酸皆為 L-form，綜合以上數據比對文獻後，確認結構為 cyclo-L-Pro-L-Leu^{46, 54} 為已知物。以上解析所得之數據詳列於表 14。

表 14、¹H- and ¹³C-NMR data of **12** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H
1	168.9	
3	46.4	3.50 (2H, m)
4	23.6	1.90 (2H, m)
5	29.9	1.90 (1H, m) 2.28 (1H, d, <i>J</i> = 5.4 Hz)
6	60.2	4.19 (1H, t, <i>J</i> = 7.7 Hz)
7	172.8	
9	54.6	4.11 (1H, t, <i>J</i> = 5.2 Hz)
10	39.4	1.51 (1H, m) 1.90 (1H, m)
11	25.8	1.90 (1H, m)
12	22.2	1.05 (3H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz)
13	23.3	1.05 (3H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz)

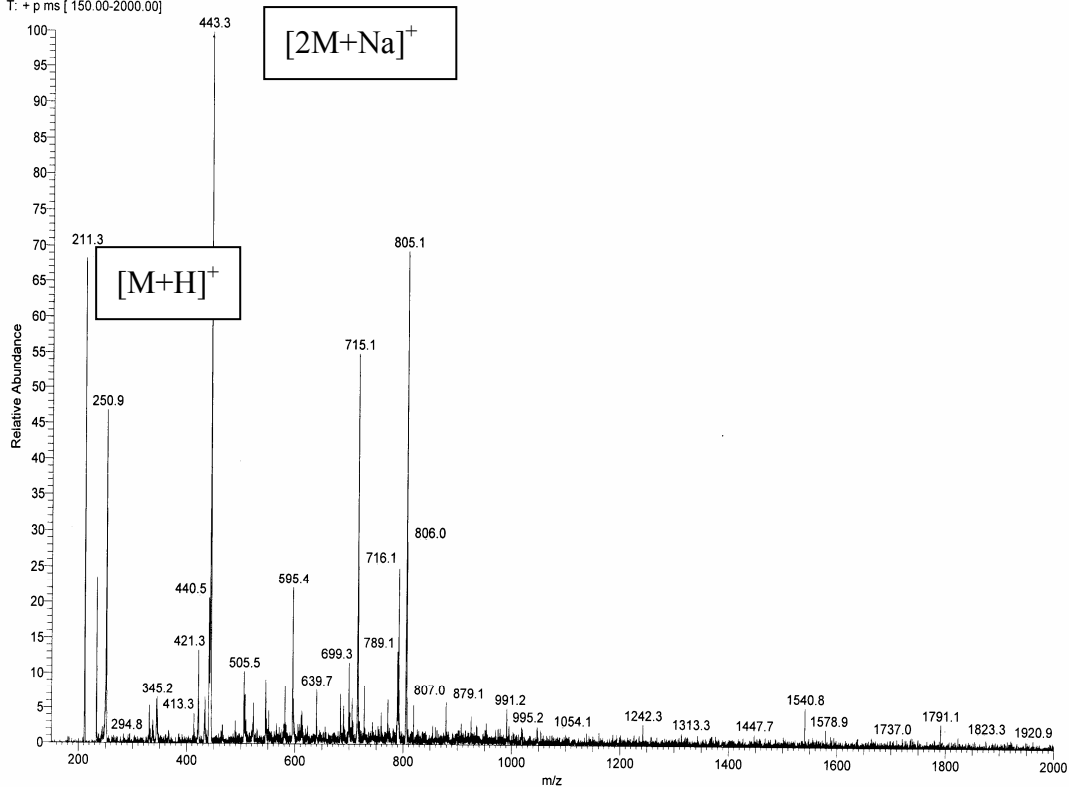
LYH 1-75-9 #1 RT: 0.01 AV: 1 NL: 2.71E6
T: + p.ms [150.00-2000.00]

圖 68、化合物 12 之電噴灑電離質譜。

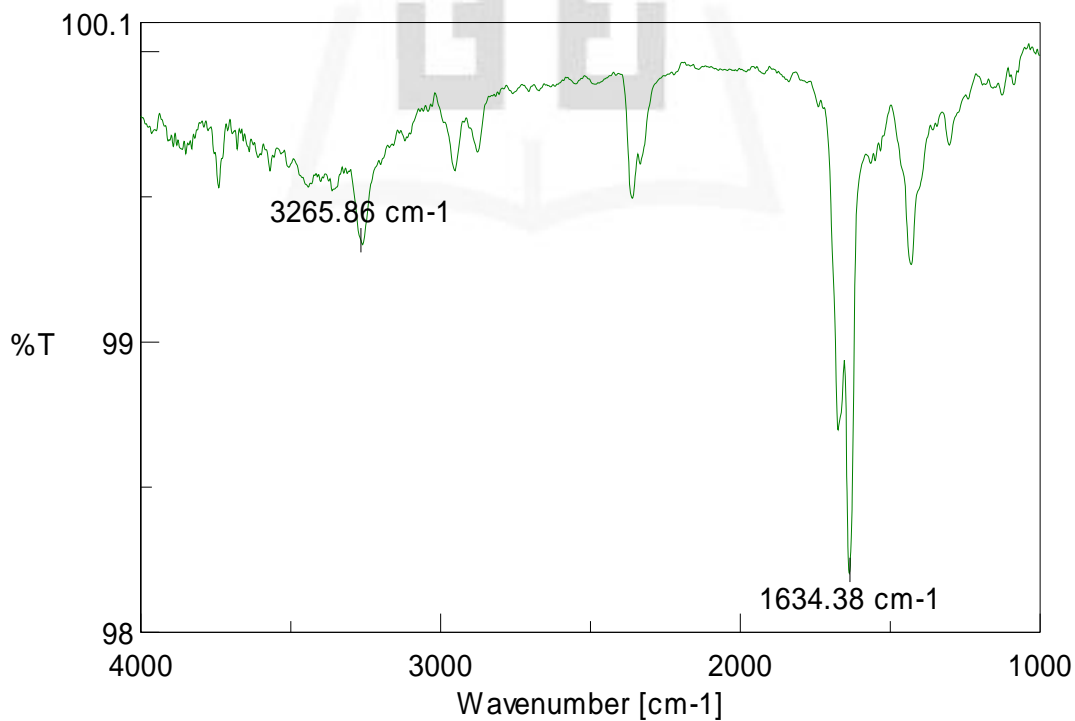


圖 69、化合物 12 之紅外光譜。

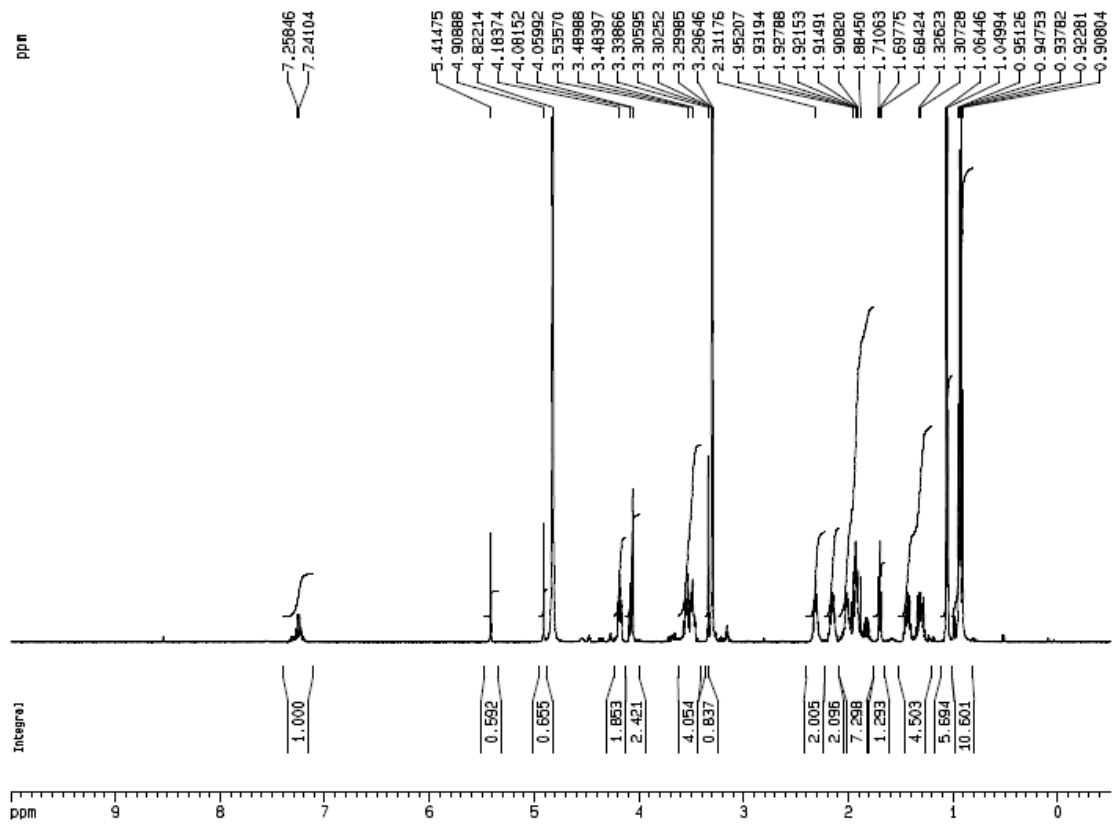


圖 70、化合物 12 之氫譜。

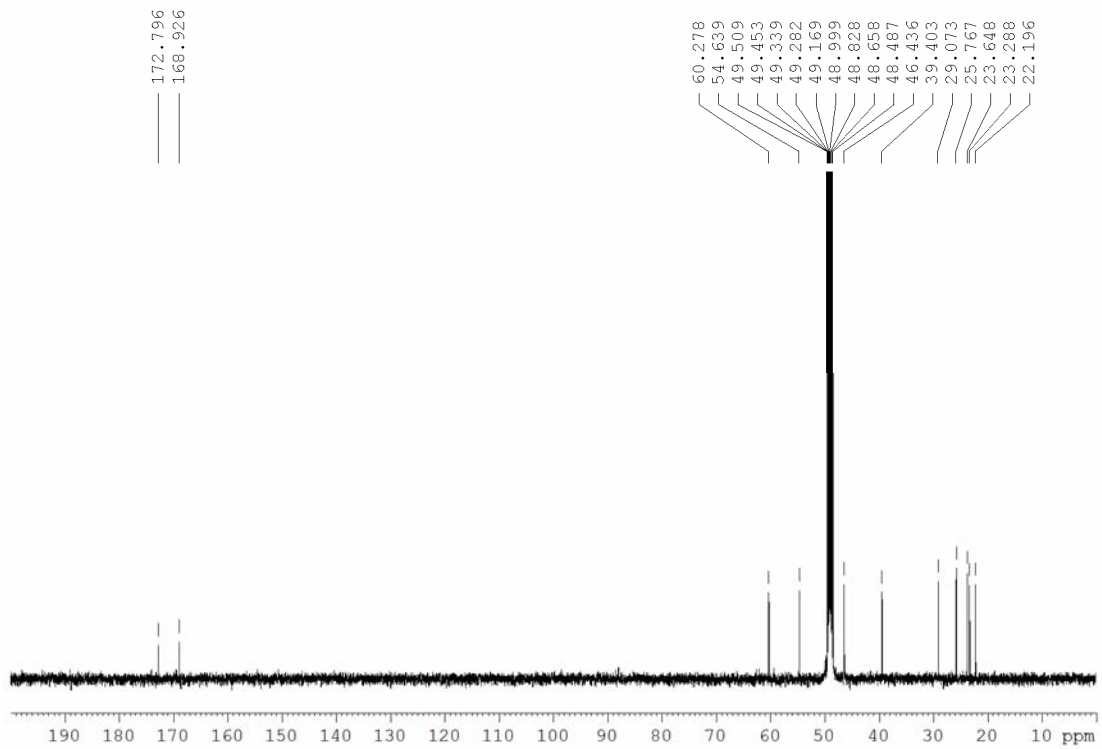
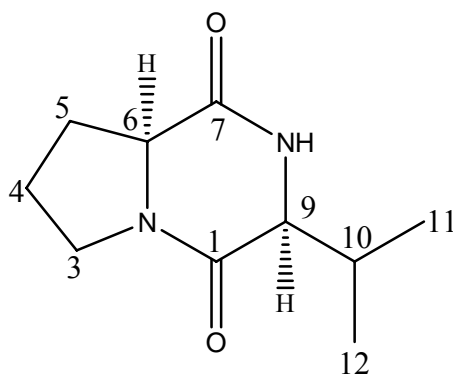


圖 71、化合物 12 之碳譜。

2.1.13 cyclo-L-Pro-L-Val (**13**) 之結構解析



化合物 **13** 為白色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} -141.0^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 197 (圖 72)。由紅外光譜顯示有胺基 (3211 cm^{-1})、醯胺羰基 (1660 cm^{-1}) 和異丙基 (1374 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 73)。

由化合物 **13** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) (圖 74)，有兩個較高場之二重峰訊號分別位於 δ_{H} 0.92 (3H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-11) 和 1.08 (3H, d, $J = 7.0\text{ Hz}$, H-12)，推測有兩個末端甲基存在。在 δ_{H} 4.02 (1H, s, H-6)、4.19 (1H, d, $J = 2.2\text{ Hz}$, H-9) 和 3.51 (1H, m, H_a -3)、3.30 (1H, t, $J = 1.8\text{ Hz}$, H_b -3) 有吸收訊號存在，推測這三組質子旁接有異原子，其中 H-6, 9 旁邊另接有其它拉電子基，使得訊號在更低場域出現。比對 ESI/MS 所得結果，得知這些異原子為氮。此外，尚有兩個亞甲基，分別位於 δ_{H} 1.93 (2H, m, H_2 -4)、2.31 和 2.47 (each 1H, m, H_2 -5)。由碳譜 (圖 75) 可知，有兩個羰基的吸收訊號分別位於 δ_{C} 168.9 (C-7) 和 δ_{C} 172.8 (C-1)，以及兩個末端甲基的訊號，分別位於 δ_{C} 18.8 (C-11) 和 δ_{C} 16.7 (C-12)，均雷同於化合物 **3** 之訊號，經由紅外線光譜的佐證含有醯

胺基，與化合物 **3** 做比對後，推測此化合物平面結構為 cyclo-Pro-Val，具有兩個立體中心。利用鹽酸水解為兩個胺基酸，使用可分析胺基酸鏡相異構物的 HPLC 管柱，再分別與標準品的滯留時間做對照，滯留時間分別為 _L-Pro (5.32 min) 和 _L-val (7.70 min)，証實化合物 **13** 所含兩個胺基酸皆為 L-form，綜合以上數據確認結構為 cyclo-_L-Pro-_L-Val^{46, 54}，是屬於已知物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 15。

表 15、¹H- and ¹³C-NMR data of **13** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H
1	168.9	
3	46.2	3.51 (1H, m) 3.30 (1H, t, <i>J</i> = 1.8 Hz)
4	23.3	1.93 (2H, m)
5	29.9	2.31 (1H, m) 2.47 (1H, m)
6	60.0	4.19 (1H, d, <i>J</i> = 2.2 Hz)
7	172.6	
9	61.5	4.02 (1H, s)
10	29.5	2.47 (1H, m)
11	18.8	0.92 (3H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz)
12	16.7	1.08 (3H, d, <i>J</i> = 7.0 Hz)

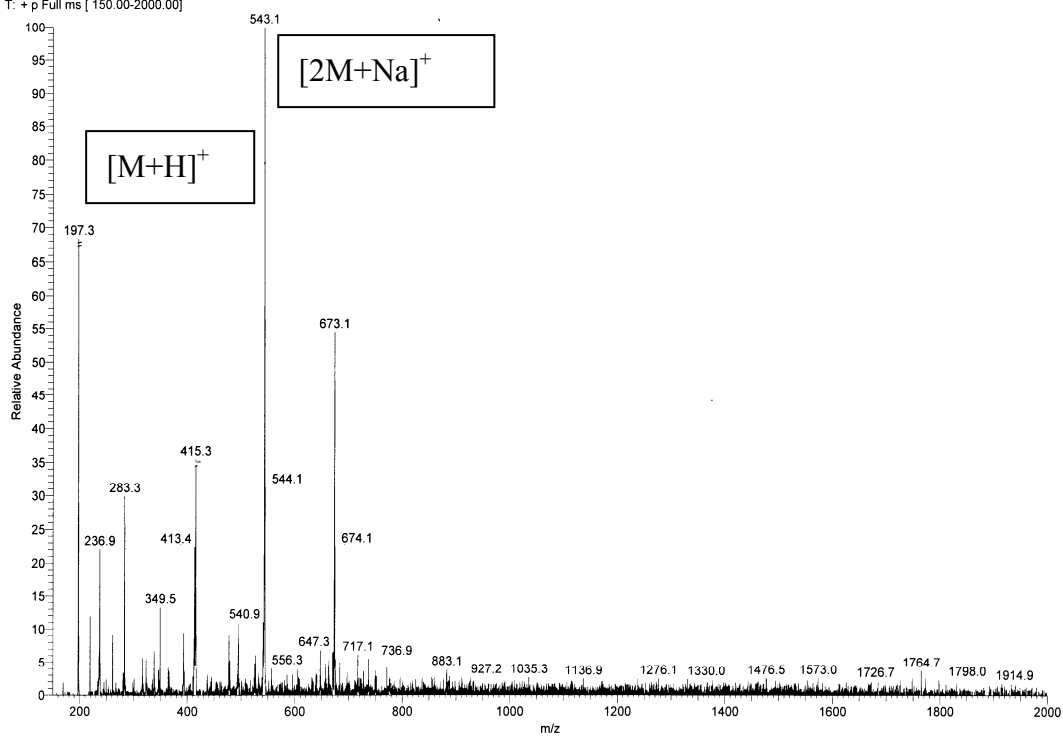
LYH 1-76-2 #1 RT: 0.03 AV: 1 NL: 2.94E6
T: + p Full ms [150.00-2000.00]

圖 72、化合物 13 之電噴灑電離質譜。

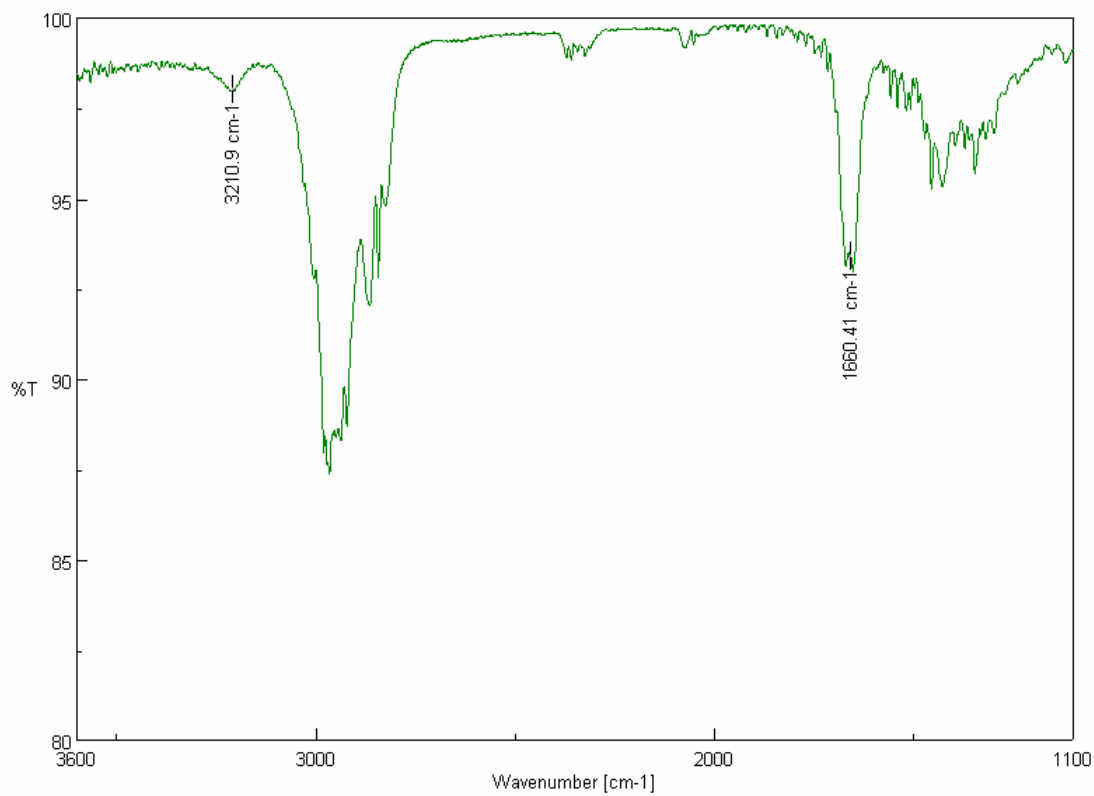


圖 73、化合物 13 之紅外光譜。

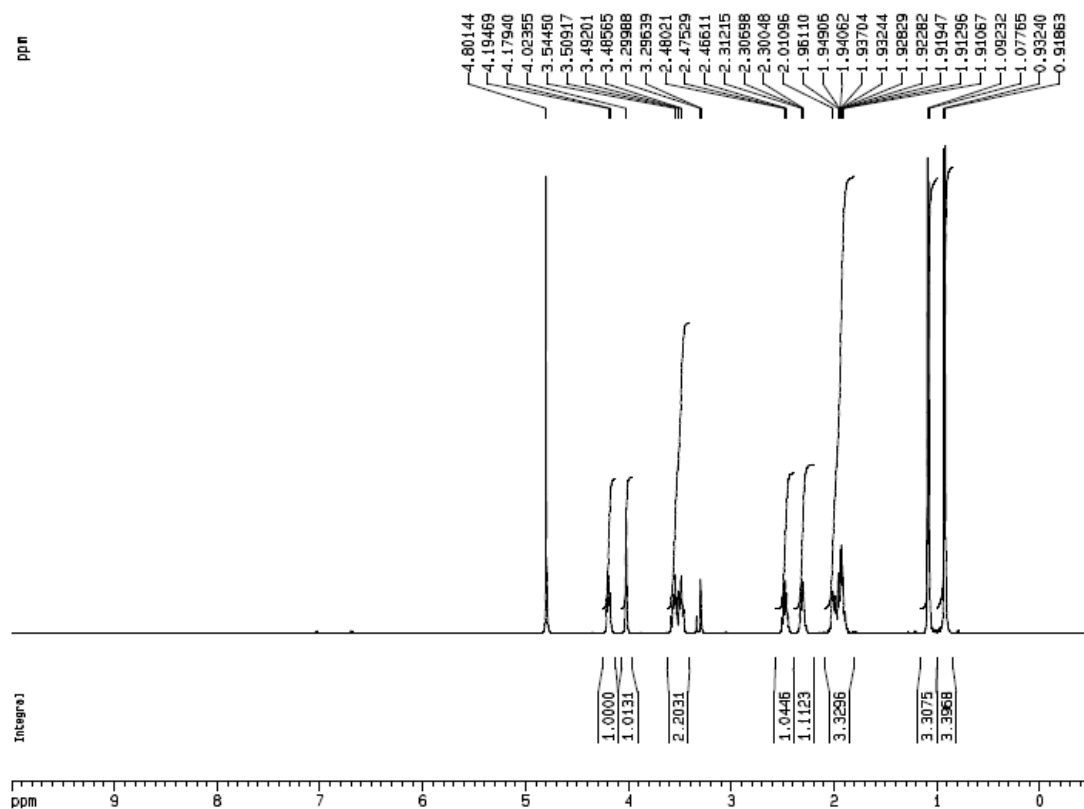


圖 74、化合物 13 之氫譜。

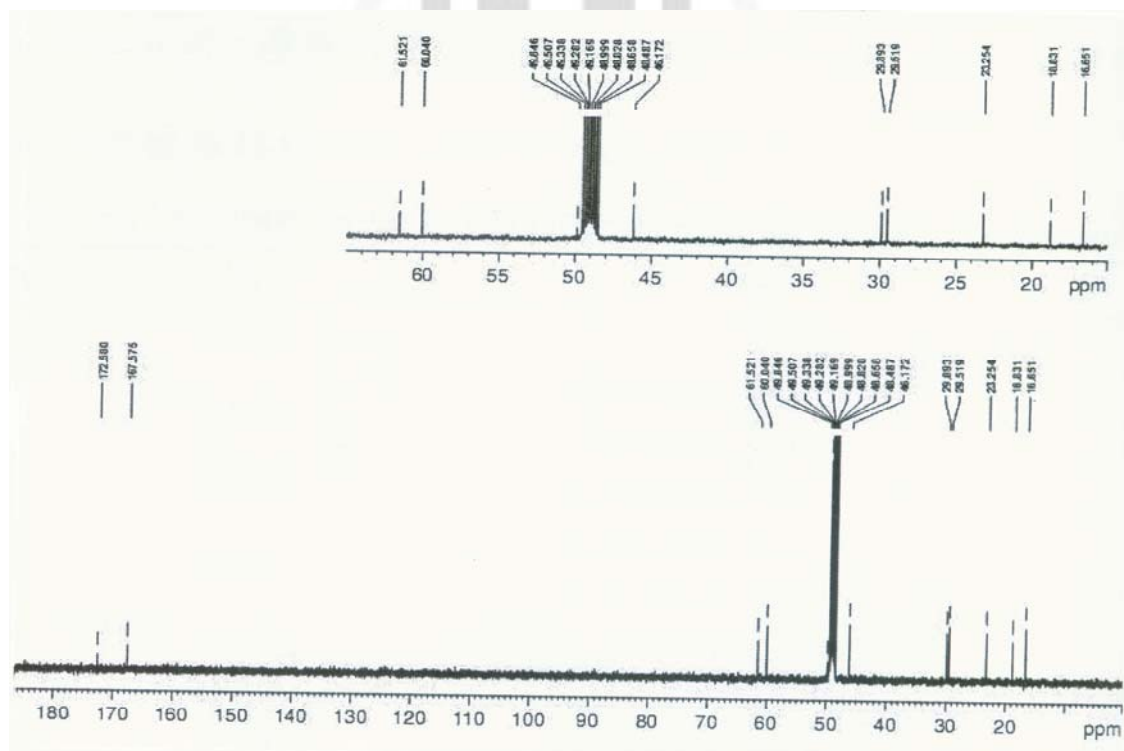
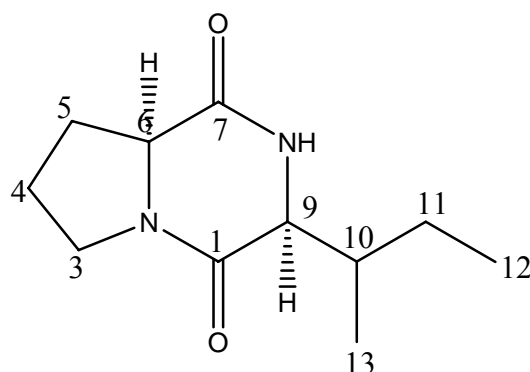


圖 75、化合物 13 之碳譜。

2.1.14 cyclo-L-Pro-L-Ile (**14**) 之結構解析



化合物 **14** 為白色無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} -24.5^\circ$ (c 0.50, MeOH)，ESI/MS 顯示其分子離子峰 $[M + H]^+$ 為 m/z 211 (圖 76)。由紅外光譜顯示有胺基 (3217 cm^{-1})、醯胺羰基 (1647 cm^{-1}) 等官能基的存在 (圖 77)。

化合物 **14** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz) (圖 78)，顯示有一個較高場之二重峰訊號位於 δ_{H} 1.05 (3H, d, $J = 7.5\text{ Hz}$, $\text{H}_3\text{-13}'$) 及一個較高場的重峰訊號位於 δ_{H} 0.92 (3H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$, $\text{H}_3\text{-12}$) 推測有兩個末端甲基存在。兩個位於較低場的質子訊號位於 δ_{H} 4.07 (1H, brs, H-9)、4.18 (1H, brs, H-6)，推測此兩個質子上接有異原子。尚有四個亞甲基，分別位於 δ_{H} 1.31 和 1.69 (each 1H, m, $\text{H}_2\text{-11}$)、 δ_{H} 1.92 和 1.95 (each 1H, m, $\text{H}_2\text{-14}$)、 δ_{H} 1.92 (2H, m, $\text{H}_2\text{-5}$) 和 δ_{H} 3.49 (2H, t, $J = 3\text{ Hz}$, $\text{H}_2\text{-3}$)。由碳譜 (圖 79) 可知，有兩個羰基的吸收訊號在 δ_{C} 167.6 (C-7) 和 δ_{C} 172.4 (C-1) 尚有兩個較高場域的訊號分別為 δ_{C} 12.6 (C-12) 和 δ_{C} 15.7 (C-13)，與氫譜訊號連結得知其分裂情況，並由紅外線光譜的佐證含有醯胺基，與化合物 **13** 做比對後，推測此化合物平面結構為 cyclo-Pro-Ile，且此結構中具有兩個立體中心。利用鹽酸水解為兩個胺基酸，使用可分析胺

基酸鏡相異構物的 HPLC 管柱，再分別與標準品的滯留時間做對照，其滯留時間分別為 L -Pro (5.33 min) 和 L -Ile (15.35 min)，對文獻後確認結構為 $cyclo-L$ -Pro- L -Ile^{46, 54} 為已知物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 16。

表 16、 1H - and ^{13}C -NMR data of **14** (CD_3OD , 500 MHz for 1H and 125 MHz for ^{13}C)

No.	^{13}C	1H
1	172.4	
3	46.1	3.49 (2H, t, $J = 3$ Hz)
4	23.2	1.92 (1H, m) 1.95 (1H, m)
5	29.5	1.92 (2H, m)
6	60.0	4.18 (1H, brs)
7	167.6	
9	61.3	4.07 (1H, d, $J = 10.8$ Hz)
10	37.1	2.31 (1H, m)
11	25.4	1.69 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)
12	12.6	0.92 (3H, t, $J = 7.5$ Hz)
13	15.7	1.05 (2H, d, $J = 7.5$ Hz) 1.31 (1H, d, $J = 7.5$ Hz)

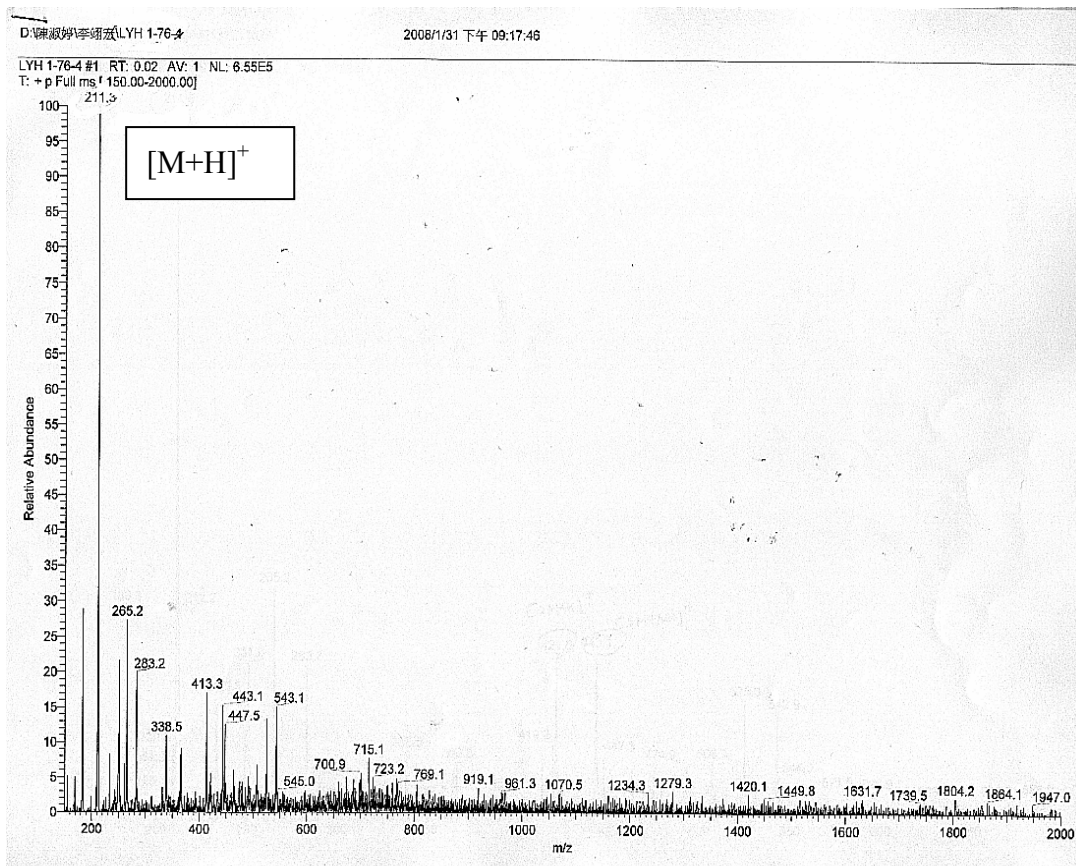


圖 76、化合物 14 之電噴灑電離質譜。

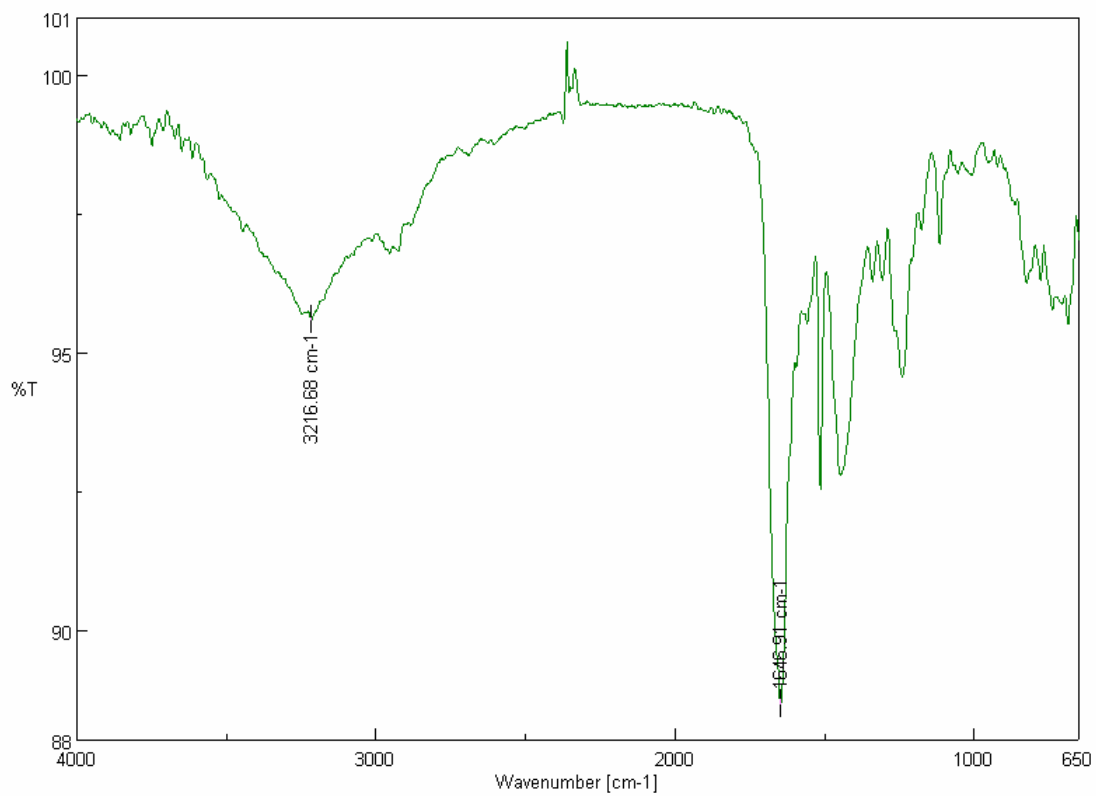


圖 77、化合物 14 之紅外光譜。

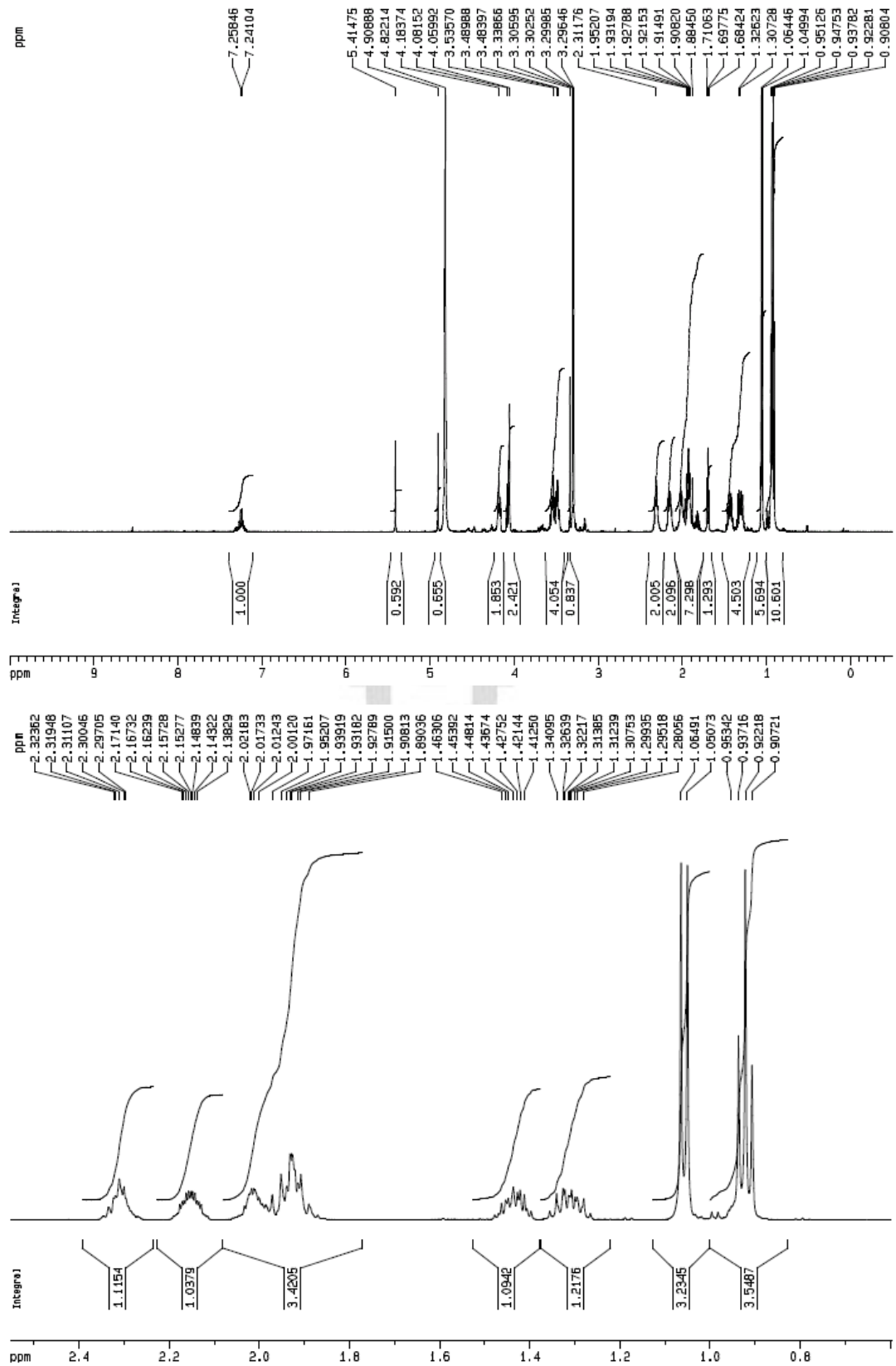


圖 78、化合物 14 之氫譜。

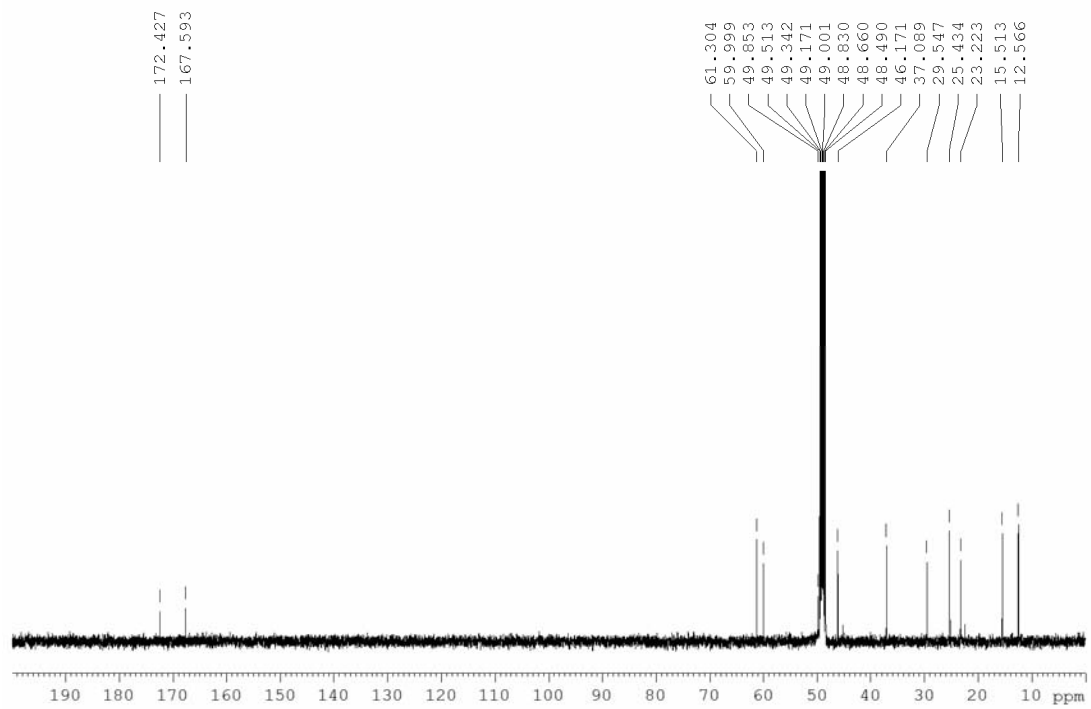
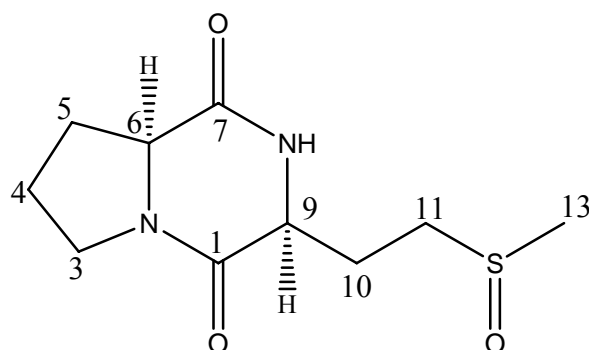


圖 79、化合物 14 之碳譜。

2.1.15 cyclo-L-Pro-L-Met sulfoxide (**15**) 之結構解析



化合物 **15** 為透明無晶型粉末，比旋光度 $[\alpha]_D^{24} -52.6^\circ$ (c 0.50, MeOH)，HRESI/MS 顯示分子離子峰 $[M + Na]^+$ 為 m/z 267.0797 (圖 80)。紅外光譜顯示有胺基 (3414 cm^{-1})、醯胺羰基 (1652 cm^{-1}) 和 硫氧基 (1014 cm^{-1}) 等官能基 (圖 81)。

化合物 **15** 的氫譜 (CD_3OD , 500 MHz)(圖 82) 顯示，兩個接有異原子的次甲基訊號在 δ_{H} 4.25 (1H, m, H-6)、4.34 (1H, m, H-9) 出現，以及五個亞甲基訊號在 δ_{H} 3.52 (2H, m, H₂-3)、 δ_{H} 1.99 (2H, m, H₂-4)、 δ_{H} 2.01 及 2.32 (each 1H, m, H₂-5)、 δ_{H} 2.28 (2H, m, H₂-10) 和 δ_{H} 2.99 及 δ_{H} 2.87 (each 1H, m, H₂-11)；在較低場域有一個吸收訊號 δ_{H} 2.65 (3H, s, H₃-13)，顯示為接有異原子的末端甲基。由碳譜 (圖 83) 得知有兩個羰基分別位於 δ_{C} 167.2 (C-1) 和 172.7 (C-7)；在高場域的訊號分別為 δ_{C} 46.5 (C-3)、23.5 (C-4)、29.3 (C-5)、60.4 (C-6)、55.2 (55.3)(C-9)、23.8 (23.9)(C-10)、49.8 (50.8)(C-11) 和 38.0 (38.2)(C-13)。由 COSY 實驗 (圖 84) 得知 δ_{H} 3.52 (2H, m, H₂-3) 與 δ_{H} 1.99 (H₂-4) 有相關；而 δ_{H} 1.99 (H₂-4) 與 δ_{H} 2.01 和 2.32 有相關； δ_{H} 2.01 和 2.28 與 δ_{H} 4.05 (H-6) 有

相關； δ_{H} 4.34 (H-9) 與 δ_{H} 2.28 (H₂-10) 互有相關。由 HMBC 實驗 (圖 85) 得知 δ_{H} 3.52 (H₂-3) 與 δ_{C} 23.5 (C-4)、29.3 (C-5) 有相關； δ_{H} 1.99 (H₂-4) 與 δ_{C} 46.5 (C-3)、29.3 (C-5) 和 60.4 (C-6) 有相關； δ_{H} 2.01 及 2.32 與 46.5 (C-3)、 δ_{C} 23.5 (C-4) 和 177.6 (C-7) 有相關； δ_{H} 4.25 (H-6) 與 29.3 (C-5) 和 172.6 (C-7) 有相關，與化合物 **4** 做比對，發現與化合物 **4** 的質子分裂形狀相似，又由紅外光譜的結果有可以印證此結構內含有一個醯胺基。所以應該具有相似的環狀脯胺酸 (cyclo-proline) 結構骨架。在側鏈部分 C-10 (δ_{C} 23.8 or 23.9)、C-11 (δ_{C} 49.8 or 50.6) 和 C-13 (δ_{C} 38.0 or 38.2) 在碳譜上都存在著兩個訊號；同時在 HSQC 實驗中顯示 (圖 86)， δ_{C} 23.8 (23.9)(C-10) 與 δ_{H} 2.28 (H-10)、 δ_{C} 49.8 (50.6)(C-11) 與 δ_{H} 2.99 (H-11)、 δ_{C} 38.0 (38.2)(C-13) 與 δ_{H} 2.65 (H-13) 互相有相關，所以推測為兩個立體結構異構物 (stereo isomers) 的混合物 (如圖 87)。又由於在 HMBC 實驗中 C-11 (δ_{C} 49.8 or 50.6) 與 H-13 (δ_{H} 2.65) 有相關，推測在 C-11 與 C-13 之間存在一個異原子，根據 HRESI-MS 的結果推測，此異原子為硫，且為一個硫氧基 (sulfoxide)，另會有一對未共用電子對，所以有立體異構物的產生 (如圖 88)，此與前述 NMR 實驗所得結論符合。此結構中除硫氧基外另具有兩個立體中心位於 C-6 與 C-9，利用鹽酸水解化合物 **15** 為兩個單胺基酸，使用可分析胺基酸鏡相異構物的 HPLC 管柱 (流動相為 1% isopropanol in 2 mM aqueous CuSO₄)，再分別與標準品的滯留時間 (L-Pro 9.3 min、L-Met Sulfoxide 6.1 min) 做比對，其滯留時間分別為 L-Pro (9.0

min)、_L- Met Sulfoxide (6.1 min)，綜合以上數據確認化合物 **15** 的結構為 cyclo-_L-Pro-_L-Met sulfoxide，為過去文獻未曾報導的新化合物。綜合以上解析所得之數據詳列於表 17。

表 17、¹H- and ¹³C-NMR data of **15** (CD₃OD, 500 MHz for ¹H and 125 MHz for ¹³C)

No.	¹³ C	¹ H	HMBC (H→C)	COSY
1	167.2			
3	46.5	3.52 (2H, m)	4, 5	4
4	23.5	1.99 (2H, m)	3, 5, 6	3, 5
5	29.3	2.01 (1H, m)	7	4, 6
		2.32 (1H, m)	3, 4	
6	60.4	4.25 (1H, m)	5, 7	
7	172.7			
9	55.2 or 55.3	4.34 (1H, dd, <i>J</i> = 4.6, 8.6 Hz)	1, 10, 11	10
10	23.8 or 23.9	2.28 (2H, m)	1, 9, 11	9, 11
11	49.8 or 50.6	2.99 (1H, m)	9, 10, 13	10
		2.87 (1H, m)		
13	38.0 or 38.2	2.65 (3H, s)	C-11	

貴重儀器使用中心 高解析質譜儀HRESI
==== Shimadzu LCMS ITTOF ====

<Spectrum>

PosESI
ScanNo:209(183-235) BaseMass:267.08 Int:1256802
C:\LabSolutions\DATA\實驗(20080312)\L\YH1-S1-2-01.Lcd

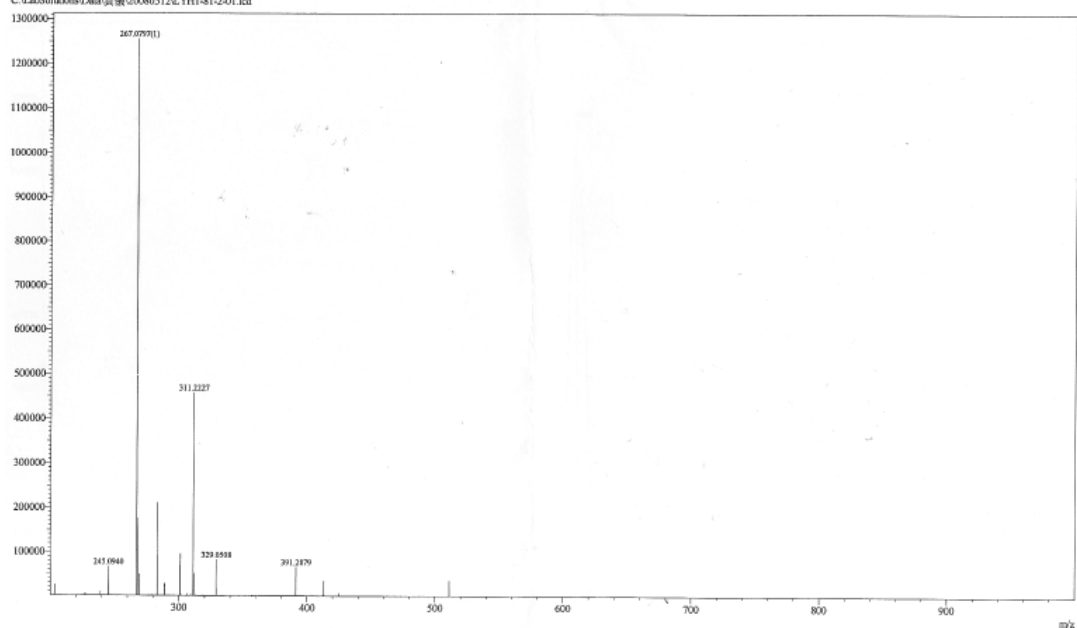


圖 80、化合物 15 之電噴灑電離質譜。

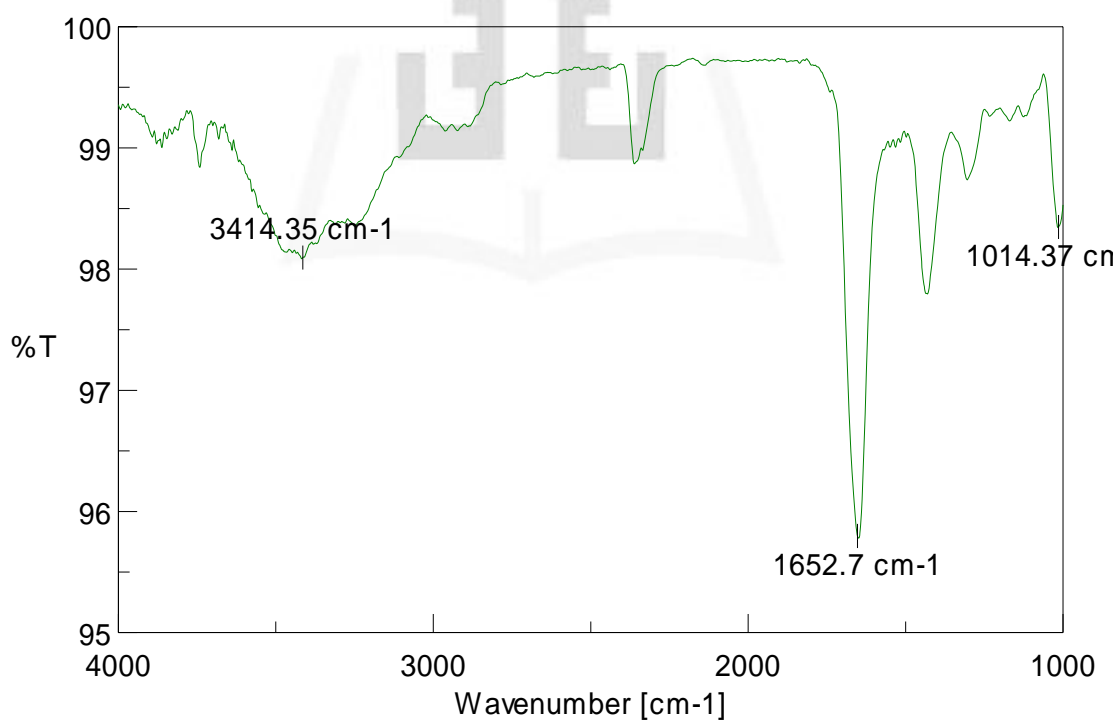


圖 81、化合物 15 之紅外光譜。

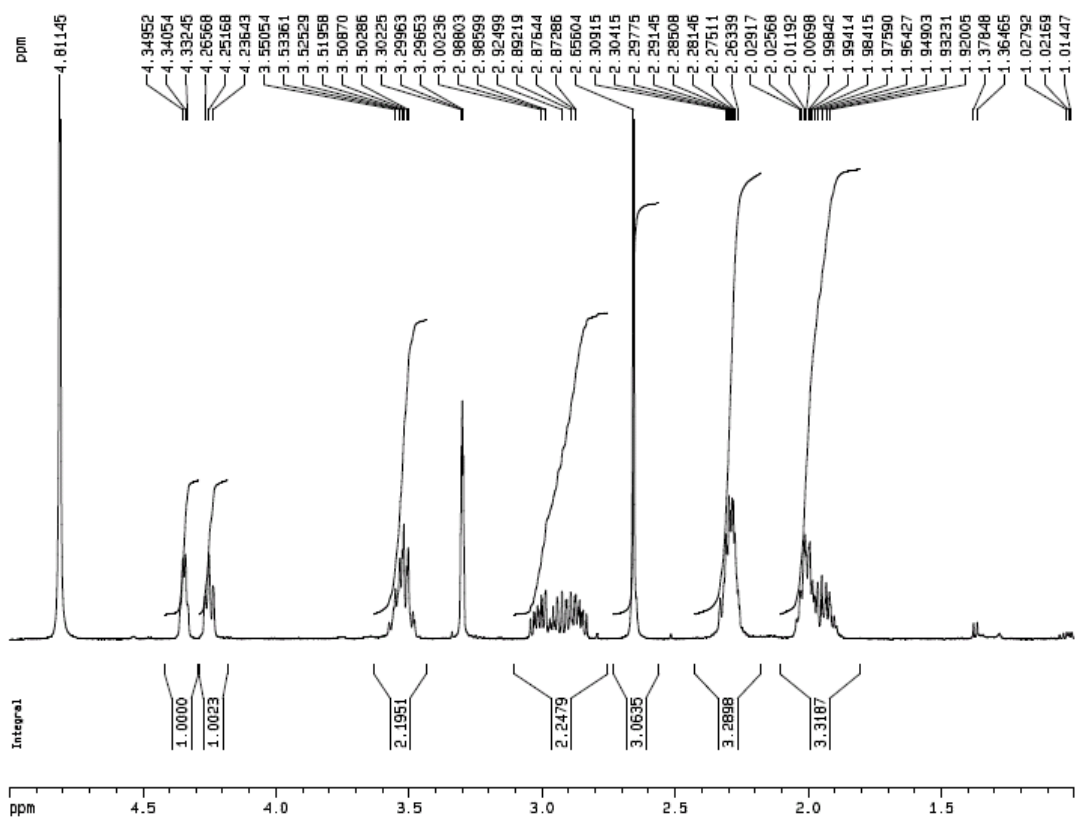
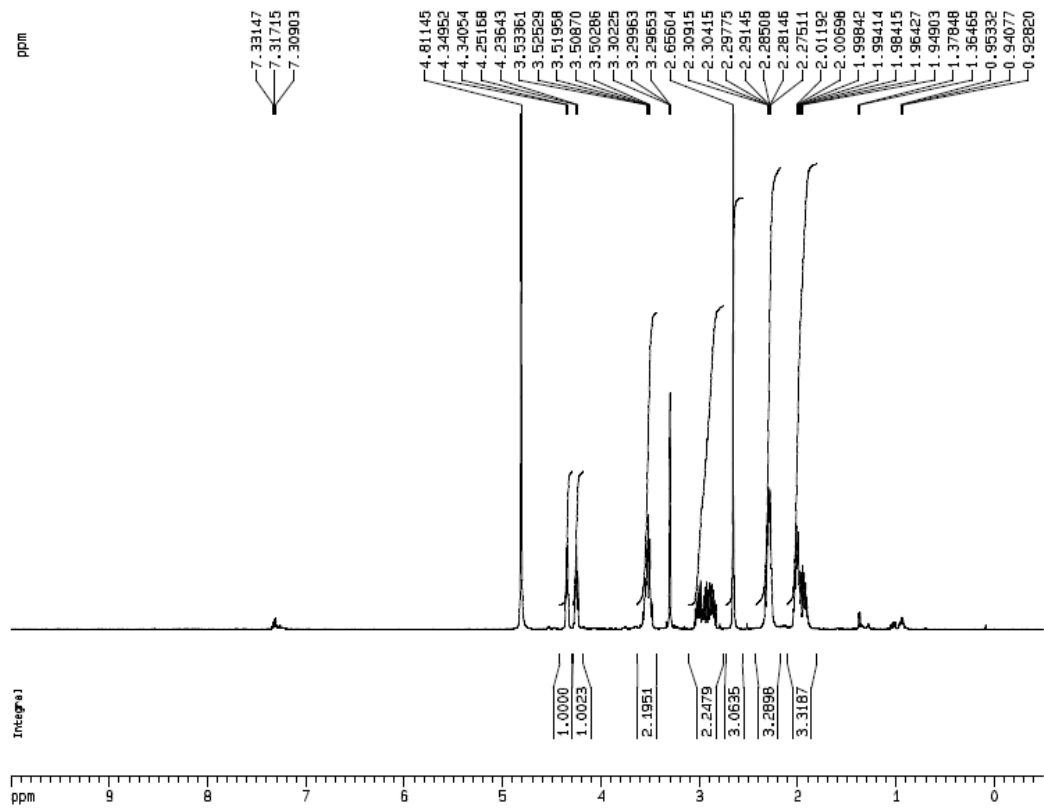


圖 82、化合物 15 之氫譜。

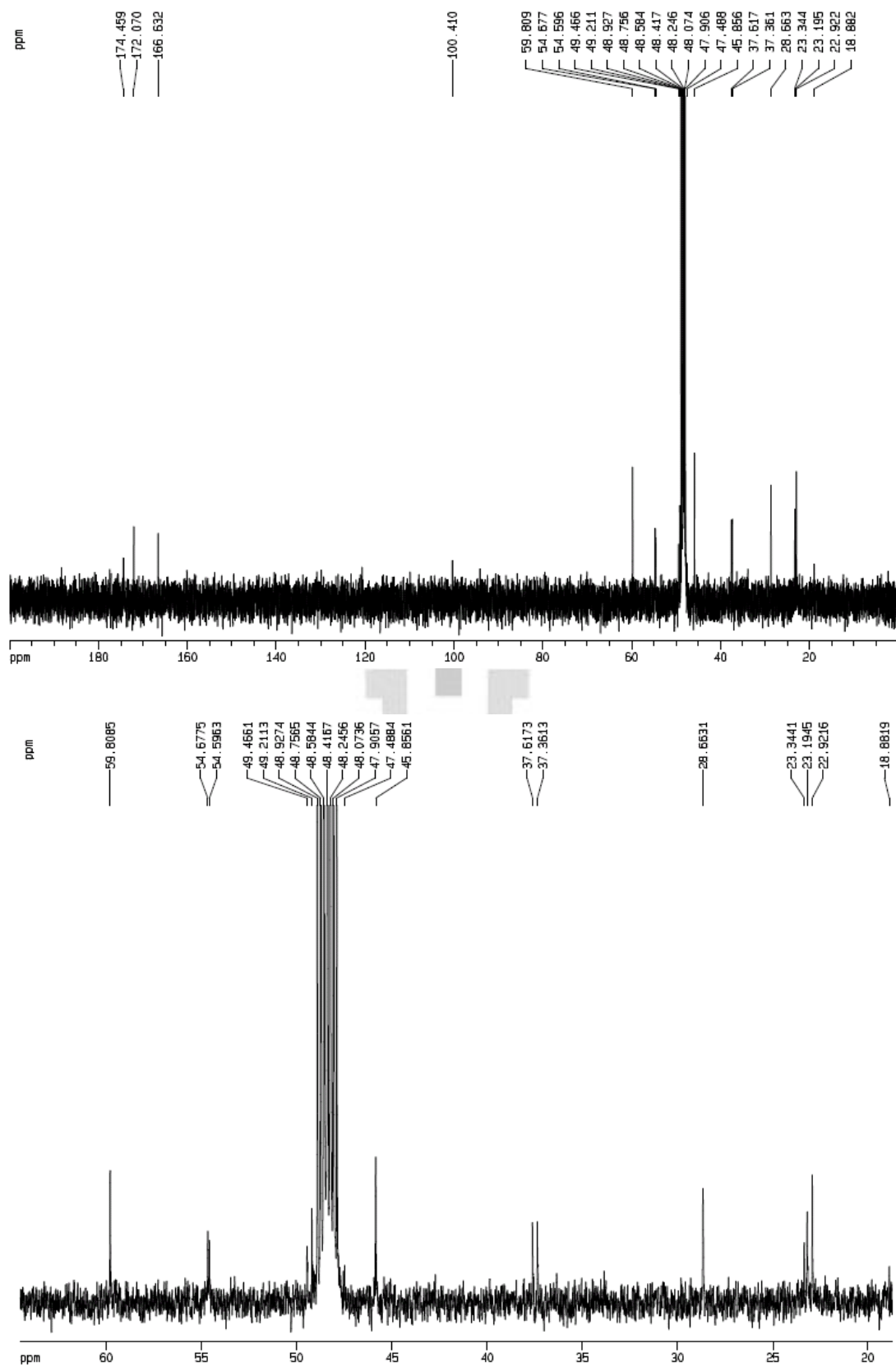


圖 83、化合物 15 之碳譜。

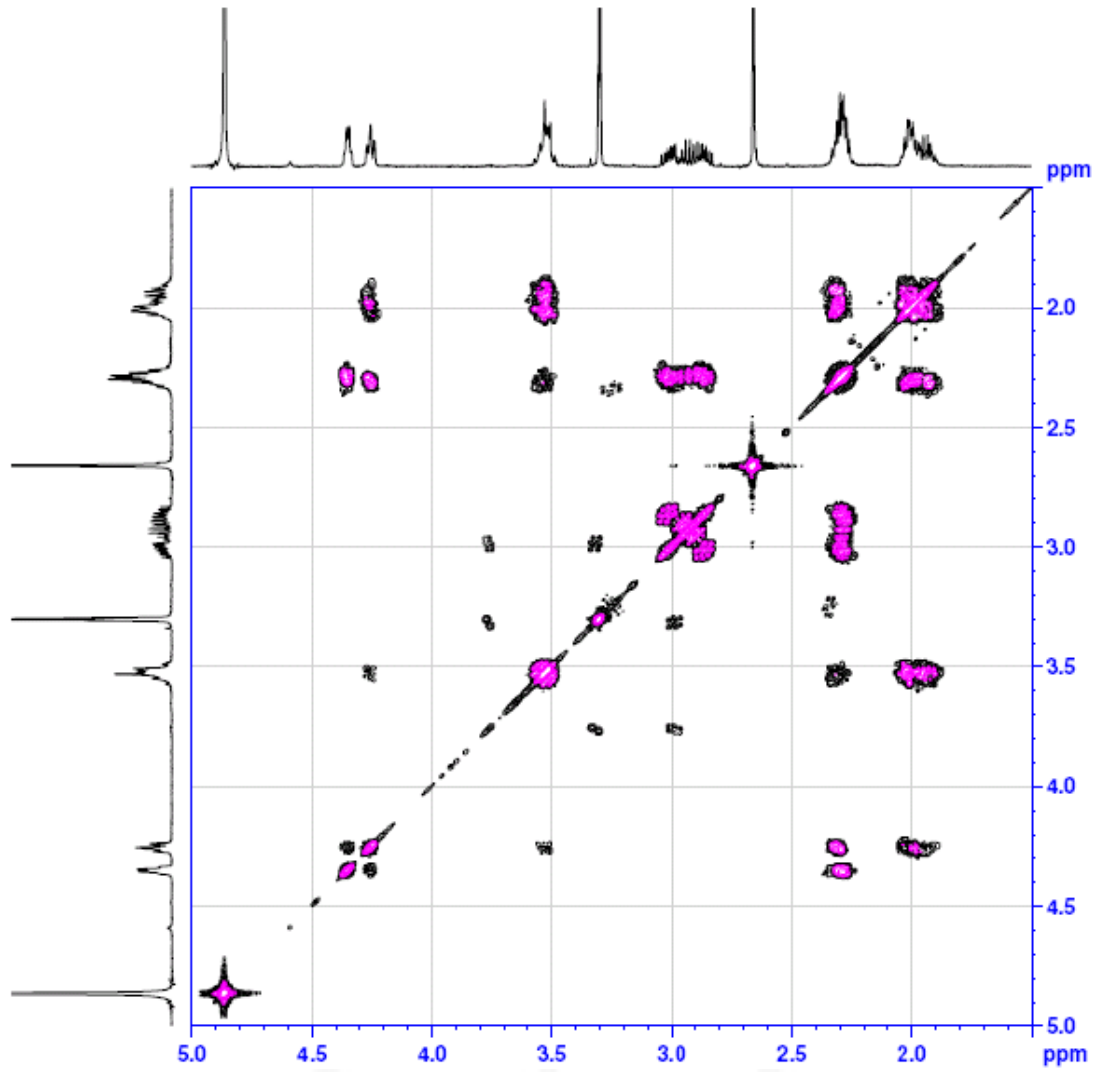
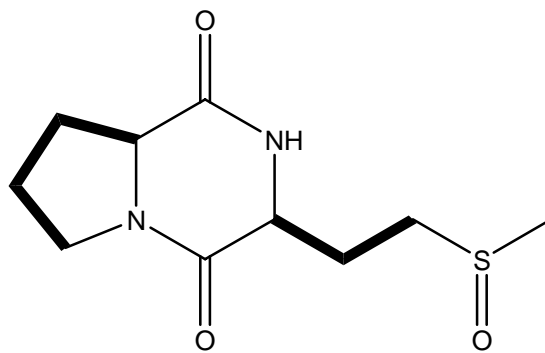


圖 84、化合物 15 之 COSY 圖譜。



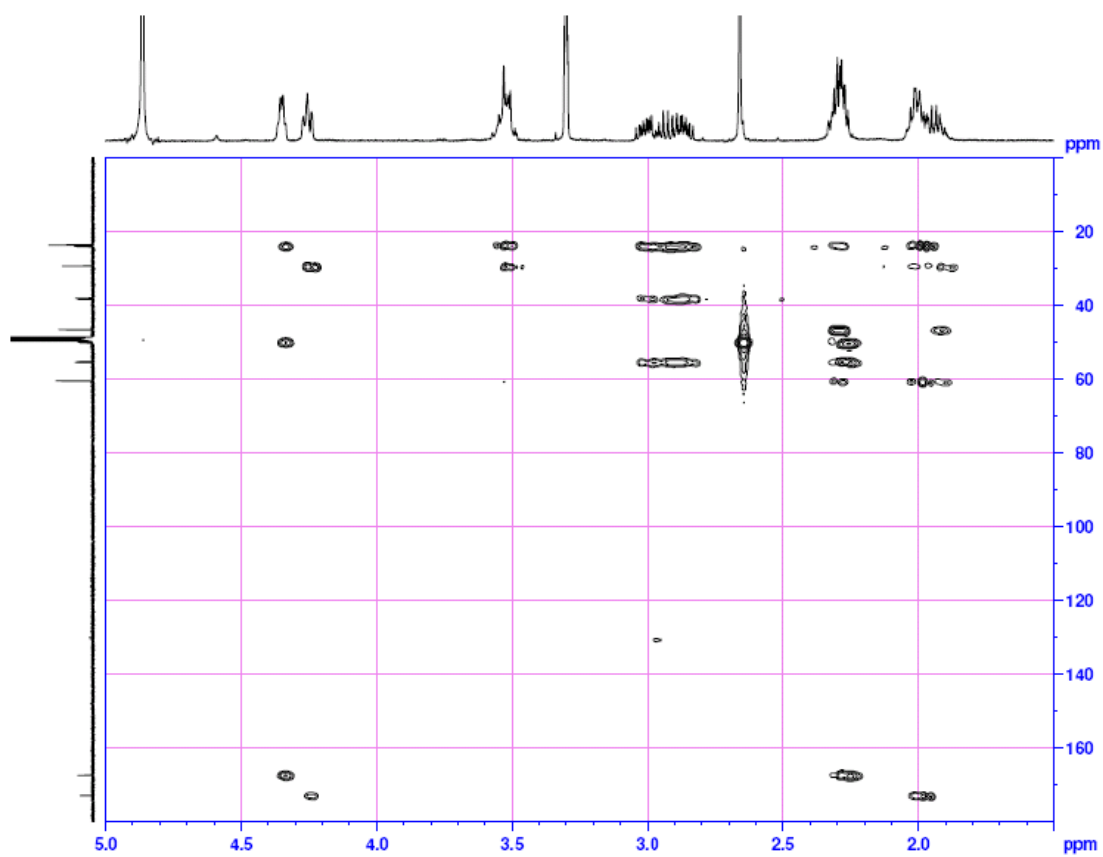
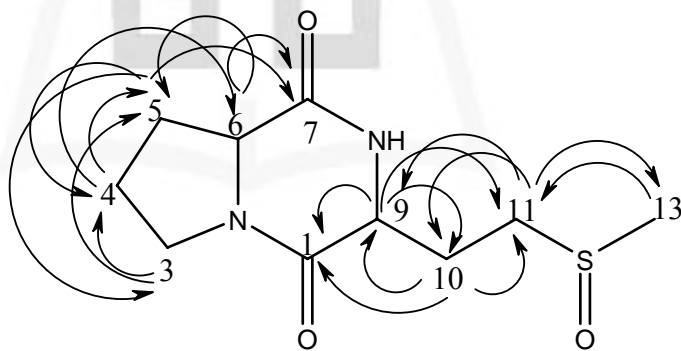


圖 85、化合物 15 之 HMBC 圖譜。



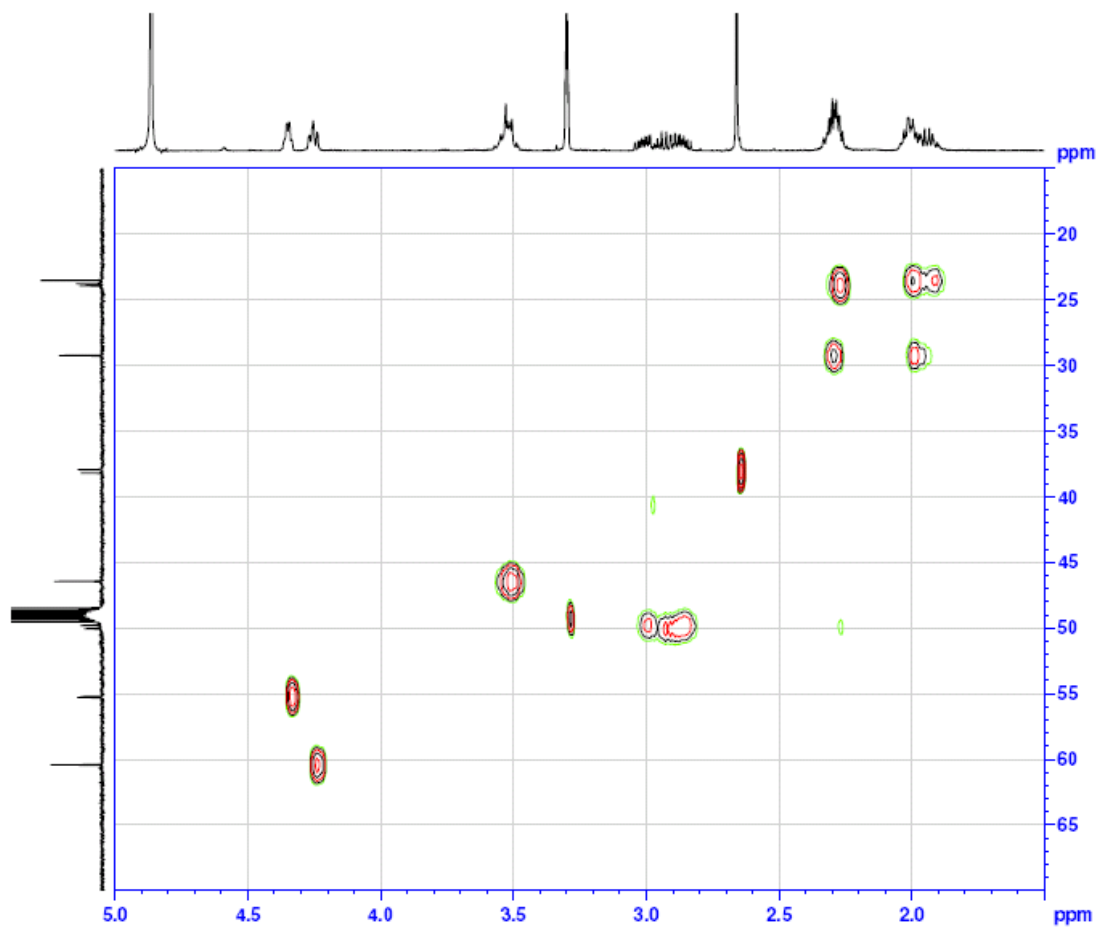


圖 86、化合物 15 之 HSQC 圖譜。

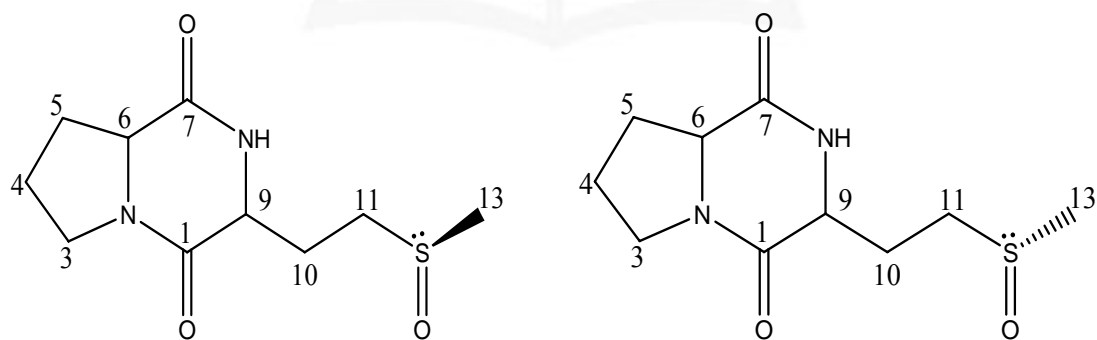


圖 87、化合物 15 的兩個立體異構物。

2.2 氨基酸水解分析結果

由可分析鏡像異構物的 HPLC 管柱檢測，與標準品對比其滯留時間，結果顯示如表 18 所示。以此方可確認胺基酸的立體組態。

表 18、胺基酸分析結果。

氨基酸分析結果		
化合物	t _{R1}	t _{R2}
cyclo-Pro-Phe (3)	L-Pro (5.3 min)	L-Phe (41.1 min)
cyclo-Pro-Tyr (4)	L-Pro (5.3 min)	L-Tyr (19.0 min)
cyclo-Pro-Leu (12)	L-Pro (5.3 min)	L-Leu (17.5 min)
Cyclo-Pro-Val (13)	L-Pro (5.3 min)	L-Val (7.7 min)
Cyclo-Pro-Ile (14)	L-Pro (5.3 min)	L-Ile (15.4 min)
cyclo-Pro-Met sulfoxide (15)	L-Pro (8.0 min)	L-Met sulfoxide (6.1 min)

[註] 標準品滯留時間 (t_R)

	t _R (min)		t _R (min)
L-Pro	5.32 (7.8) ^a	D-Pro	11.7
L-Val	7.9	D-Val	12.3
L-Leu	17.4	D-Leu	27.1
L-Ile	15.3	D-Ile	26.1
L-Phe	41.9	D-Phe	68.8
L-Tyr	18.9	D-Tyr	27.8
L-Met sulfoxide	6.06		

流動相：5% Isopropanol in 2mM aqueous CuSO₄

流速：1 ml/min

偵測器：UV 254 nm

Ps. L-Methionine sulfoxide 使用之流動相為 1% Isopropanol in 2 mM aqueous CuSO₄。

^a L-Pro 使用流動相為 1% Isopropanol in 2mM aqueous CuSO₄ 的滯留時間。為化合物 **15** 所使用之條件。

2.3 抑制抗藥性金黃色葡萄球菌生長之試驗結果

2.3.1 105 株海洋細菌初篩結果

由立德管理學院簡文達老師所提供的菌株 105 株，使用瓊脂擴散法進行抑菌試驗，所得結果如表 19，其中 #M1B 和 #AW52 二株菌有抑菌效果，#M1B 有較顯著抑制抗藥性金黃色葡萄球菌的能力；#AW52 的抑菌能力，則與正向控制組的 penicillin G 的效果相當，經評估後，選擇 #M1B 與 #AW52 等菌株進行其抑菌活性化合物的探究。

表 19、海洋細菌菌液萃取液汁抗菌活性初篩結果。

	<i>S.a.</i> ^a (mm)
M1B	26
AW52	11
MO6	— ^b
Penicillin G	9

^a 抗藥性金黃色葡萄球菌 (Penicillin G-resistant *S. aureus*)。

抑菌圈測量方式：測量抑菌圈的直徑，以最小刻度為 1mm 的尺測量。

^b—：沒有抑制效果。

2.3.2 抑制創傷弧菌及金黃色葡萄球菌生長之試驗結果

將抗藥性金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*) 分別以 128 ($\mu\text{g/ml}$)、64 ($\mu\text{g/ml}$)、32 ($\mu\text{g/ml}$)、24 和 12 $\mu\text{g/ml}$ 等濃度之化合物進行生長抑制試驗，待 24 小時後，測定其 OD_{600} 值，並將其培養至培養皿上計算其個數，藉以推算出最小抑制濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC)，可得知化合物抑制此兩種病原菌之活性大小。如表 20 所示，作為正向控制組的 penicillin G 在 64 $\mu\text{g/ml}$ 會有顯著的抑制金黃色葡萄球菌。表 20 顯示，化合物 5、6 在 32 $\mu\text{g/ml}$ 與 11 在 24 $\mu\text{g/ml}$ 對於金黃色葡萄球菌有明顯抑制，相較於正向控制組有差不多的活性。化合物 1 與 11 結構相似，但是抑菌能力略差。

表 20、化合物 1~15 對金黃色葡萄球菌之最小抑制濃度
(minimum inhibitory concentration, MIC)。

Compounds	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
(1) 2- <i>n</i> -heptylquinol-4-one	64
(2) 2-aminophenyl acetate	> 128
(3) Cyclo-L-Pro-L-Phe	> 128
(4) Cyclo-L-Pro-L-Tyr	> 128
(5) hydroxyphenazine	32
(6) Phenazine-1-carboxamide	32
(7) <i>N</i> -(2'-Phenylethyl)isobutyramide	> 128
(8) 2-Ethyl- <i>N</i> -(2'-phenethyl)butyramide	> 128
(9) 2-Methyl- <i>N</i> -(2'-phenylethyl) butyramide	> 128
(10) <i>N</i> -(2'-phenylethyl)isovaleramide	> 128
(11) 2-heptyl-4-hydroxyquinoline- <i>N</i> -oxide	24
(12) Cyclo-L-Pro-L- Leu	>128
(13) Cyclo-L-Pro-L-Val	120
(14) Cyclo-L-Pro-L-Ile	>128
(15) cyclo-L-Pro-L-Met sulfoxide	>128
Penicillin G ^a	64

^a 針對金黃色葡萄球菌之正向控制組

2.4 細胞毒性測試結果

以測試細胞毒性的方式來評估化合物是否有抑制癌細胞的潛力，由表 21 顯示得知化合物 **1**、**11** 是較具有細胞毒性，並且發現化合物 **1**，針對多種人類癌細胞具有較廣泛性的效果。化合物 **1** 與 **11** 為結構類似物。

表 21、化合物 1~5 及 7~11 抑制人類多種癌細胞生長之 IC₅₀

Compounds	IC ₅₀ (μM) ^a				
	NPC-tw01 ^b	HCT-116 ^c	A498 ^d	Jurkat ^e	H661 ^f
(1)	7.10	8.32	45.68	8.11	14.75
(2)	>50	>50	>50	>50	>50
(3)	>50	>50	>50	>50	>50
(4)	44.09	38.99	>50	>50	>50
(5)	>50	>50	>50	>50	>50
(7)	>50	>50	>50	>50	>50
(8)	>50	>50	>50	>50	>50
(9)	>50	>50	>50	>50	>50
(10)	>50	>50	>50	>50	>50
(11)	7.12	>50	>50	8.80	11.09

(1) 2-*n*-heptylquinol-4-one、**(2)** 2-aminophenyl acetate、**(3)** cyclo-L-Pro-L-Phe、
(4) cyclo-L-Tyr-L-Pro、**(5)** hydroxyphenazine、**(7)** *N*-phenethylisobutyramide、**(8)**
N-phenethylpropan-1-amine、**(9)** 2-methyl-*N*-phenethylbutanamide、**(10)**
 3-methyl-*N*-phenethylbutanamide、**(11)** 2-heptylquinolin-4-ol

^a 投與化合物之多種劑量，反應三天，利用 MTT assay 測定細胞存活率，IC₅₀ (抑制率 50% 之藥物濃度)，此數據為三次結果平均數。

^b NPC-tw01 (人類鼻咽癌細胞)

^c HCT-116 (人類結腸癌細胞)

^d A498 (人類腎臟癌細胞)

^e Jurkat (淋巴球癌細胞)

^f H661 (肺癌細胞)

2.5 討論

本研究利用瓊脂擴散法篩選 105 株台灣種海洋細菌，獲得 2 株較具有抑菌活性之菌株，挑選對抗藥性金黃色葡萄球菌有較強抑制能力的 #M1B 與 #AW52。在血管舒張活性 (vasorelaxing activities) 的實驗上，#M1B (*P. aeruginosa*) 和 #MO6 (*B. firmus*)，對於抑制 Phenylephrine 所引起的血管收縮有明顯效果。故選定這三株菌進行大量培養。經由一系列的分離、分析、純化與結構鑑定，從以上三株菌中得到 15 個天然化合物，包括：兩個奎林生物鹼化合物 (quinoline alkaloids): 2-n-heptylquinol-4-one (1) 和 2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (11)；兩個吩嗪生物鹼 (phenazine alkaloids): phenazine-1-carboxamide (5) 和 hydroxyphenazine (6)；五個芳香胺衍生物 (phenylamides derivatives): *N*-(2'-Phenylethyl)isobutyramide (7)、2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide (8)、2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide (9) 和 *N*-(2'-phenylethyl)isovaleramide (10)；六個雙胺基酸環化衍生物 (diketopiperazine): cyclo-_L-Pro-_L-Phe (3)、cyclo-_L-Tyr-_L-Pro (4)、cyclo-_L-Pro-_L-Ile (12)、cyclo-_L-Pro-_L-Val (13)、cyclo-_L-Pro-_L-Leu (14) 和 cyclo-_L-Pro-_L-Met sulfoxide (15)；以及 2-aminophenyl acetate (2)。其中 cyclo-_L-Pro-_L-Met sulfoxide (15) 是首次發現的新化合物。天然物純質在抗菌活性試驗的結果顯示，化合物 1、5、6 和 11 對於抑制抗藥性金黃色葡萄球菌有明顯的抑制能力。但是化合物 1 與 11 有較強的細胞毒性，所以對於是

否可實際使用，仍需經過很多試驗來做評估。並且抑菌機制尚未明瞭，將來可以做更多的探討。到目前為止，對於研究海洋抗菌活性物質已累積了初步的經驗，並且由篩選得到的海洋菌株得到了一些具有潛力的活性化合物，在未來的研究上可以延續此方法，進一步的分離、純化出更多新穎結構的活性物質。並將這些具有活性的天然物探討其作用機制，以期待對新的藥劑開發有所助益。



參、實驗部份

3.1 儀器設備與試劑

各化學成分之物性測定儀器：

IR: Jasco FT/IR 4100 spectrometer (Tokyo, Japan)

UV: Thermo UV-Visible Helios α Spectrophotometer (Bellefonte, CA, USA)

MS: Finnigan Thermo Quest MAT 95XL spectrometer (Bremen, Germany)

JMS-700 high performance mass spectrometer (Tokyo, Japan)

NMR: Bruker DMX-500 SB spectrometer (Ettlingen, Germany)

Optical Rotation: Jasco P-1020 digital polarimeter (Tokyo, Japan)

高效能液相層析系統：

偵測儀：

UV: Hitachi L-7400 (Tokyo, Japan)

RI: Bischoff (Leonberg, Germany)

幫浦：

Hitachi L-7100 (Tokyo, Japan)

管柱：

Thermo Hypersil BDS C₁₈ column (10 × 250 mm, 5 mm)(Bellefonte CA, USA)

Thermo Quest Hyperprep HS C18 column (10 × 250 mm, 8 mm)(Bellefonte CA, USA)

Thermo Hypersil-100 Silica column (10 × 250 mm, 5 mm)(Bellefonte CA, USA)

ChirexTM Phenomenex 3126 (4.6 × 250 mm) ligand exchange column (Torrence, CA, USA)

管柱色層層析系統：

Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences, Filial Sverige, Sweden)

SPE C₁₈ column (J.T.Baker, 40 mm, New Jersey, USA)

Silica gel (6 nm, 63~210 μ m)(長雅，台北，台灣)

薄層層析系統:

層析片:

TLC aluminum sheets, silica gel 60 F₂₅₄ plates (0.2 mm, Merck, Darmstadt, Germany)

展開溶媒組成:

A: EA/AcOH/H₂O (85:10:10, v/v/v)

B: Hex/EA (7:3, v/v)

C: Hex/EA (1:1, v/v)

D: Hex/EA (4:1, v/v)

顯色劑:

Vanillin (0.5 g) in 250 mL H₂SO₄/MeOH (1:4, v/v)

試劑器材與溶劑:

Trifluoroacetic acid (G.R., Merck, Darmstadt, Germany)

HCl (Acros, New Jersey, USA)

Acetic acid, Magnesium sulphate, Sulfuric acid (G.R., 長雅, 台北, 台灣)

Methanol, *n*-hexane, ethyl acetate (G.R., Merck, Darmstadt, Germany)

Methanol, acetonitrile (L.C., J.T. Baker, New Jersey, USA)

n-Butanol (A.R., Lab Scan, Bangkok, Thailand)

Isopropanol (A.R., Mallinckrodt, USA)

CD₃OD, CDCl₃ (Merck, Darmstadt, Germany)

胺基酸標準品:

L-Proline、L-phenylalanine、L-Methionine、L-Tyrosine、L-Leucine、L-Isoleucine、

L-Valine、L-Methionine sulfoxide、D-Proline、D-phenylalanine、D-Methionine、

D-Tyrosine、D-Leucine、D-Isoleucine、D-Valine (全部購自於 Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

3.2 培養基配置

Polypeptone yeast (PY) agar 用於菌株篩選；PY broth, Marine broth: 用於細菌培養；PY stab: 用於細菌保種。以上四種培養基成分詳列於表 22。使用時將配好的培養基於 121 °C 滅菌 15 分鐘。

表 22、本研究中所使用之各種培養基配方。

Composition	PY broth	PY-agar	PY-stab	Marine Broth
Polypepton ^a	6 g	3 g	3 g	4 g
Bacto yeast extract ^b	2 g	1 g	1 g	0.75 g
NaCl ^c	30 g	30 g	30 g	15 g
MgCl ₂ .6H ₂ O ^c	5 g	5 g	—	4.5 g
CuCl ₂ ^c	4 mg	4 mg	—	—
CaCl ₂ ^c	5 mg	5 mg	—	—
FeCl ₃ ^c	6 mg	6 mg	—	—
Na ₂ MoO ₄ .7H ₂ O ^c	5 mg	5 mg	—	—
Deionized water	1000 ml	1000 ml	300 ml	1000 ml
Sea water	—	—	700 ml	—
PH	8.0	8.0	8.0	7.6
Agar ^b	—	15 g	10 g	—
Marine Broth 2216 ^b	—	—	—	12 g

^a購自於 Nihon Seiyaku (Tokyo, Japan)；

^b購自於 Difco (New Jersey, USA)；

^c購自於 J.T.Baker (New Jersey, USA)

3.3 抑菌活性測試：

- 將海洋細菌經由萃取後的初萃物與病原菌做活性測試。先將病原菌接種於 PY 培養液中進行培養 1~2 天，以待進行實驗。病原菌為抗藥性金黃色葡萄球菌 (*S. aureus*) (ATCC 11631)。

*標準菌株均由新竹食品工業發展研究所菌種保存及研究中心所提供。

- Penicillin G-resistant *Staphylococcus aureus* (ATCC 11631)

來源：human pleural fluid

特性：金黃色葡萄球菌為格蘭氏陽性菌，菌落呈現黃色，多存在於人和動物體表的皮膚與黏膜，致病能力強。引起傷口化膿及食物中毒，且容易產生抗藥性，因此會造成治療上的困難。

- 試驗菌株來源：
 - a. 由台南安平港所分離到之新種菌株
 - b. 基隆南雅漁港岸邊所採集分離到之菌株

3.3.1 瓊脂紙錠擴散試驗 (disc agar-diffusion test)

取抗藥性金黃色葡萄球菌菌液 0.1 mL，均勻塗佈於 PY-agar plate 上，再將自待測菌之粗萃取液稱得 20 mg 溶於 1 mL 甲醇溶液中，取 50 μ l 滴於紙錠上，使其充分吸收，揮發至乾後，分別等距貼於 plate 上，觀察紙錠周圍是否有抑菌圈產生，觀測抑菌圈大小。

3.3.2 海洋細菌活性成分抑制抗藥性金黃色葡萄球菌之濃度測試

3.3.2.1 細菌培養方式

將病原菌 *S. aureus* 接種於滅菌後之 PY Broth (10 mL)，並將其置於 30 °C 培養箱醱酵 18 小時。

3.3.2.2 細菌的計數

將病原菌於無菌操作台中，震盪混合均勻後，取 50 μ L 菌液加入至以滅菌好之培養液 10 mL，混合均勻後，取 20 μ L 菌液滴至細胞計算器上方凹槽，並取 10 μ L 碘液均勻混合之，覆上蓋玻片，於顯微鏡下觀察，金黃色葡萄球菌為圓球狀。計數九宮方格裡的左上、左下、右上及右下四格的細菌數 (位於線上細菌只計上線及右線)，數目平均為 119 個，所以在培養液中即有 2.4×10^7 CFU/ mL。

3.3.2.3 天然化合物濃度配置

將化合物 1~15 於無菌操作台內利用 DMSO 為溶劑，加入滅菌好之 PY 培養液作等倍稀釋 (使 DMSO 溶度低於 3%)，依序為 200、100、50、25 μ M/mL，每一樣品之濃度配製為 900 μ L。

3.3.2.4 最小抑制濃度測試

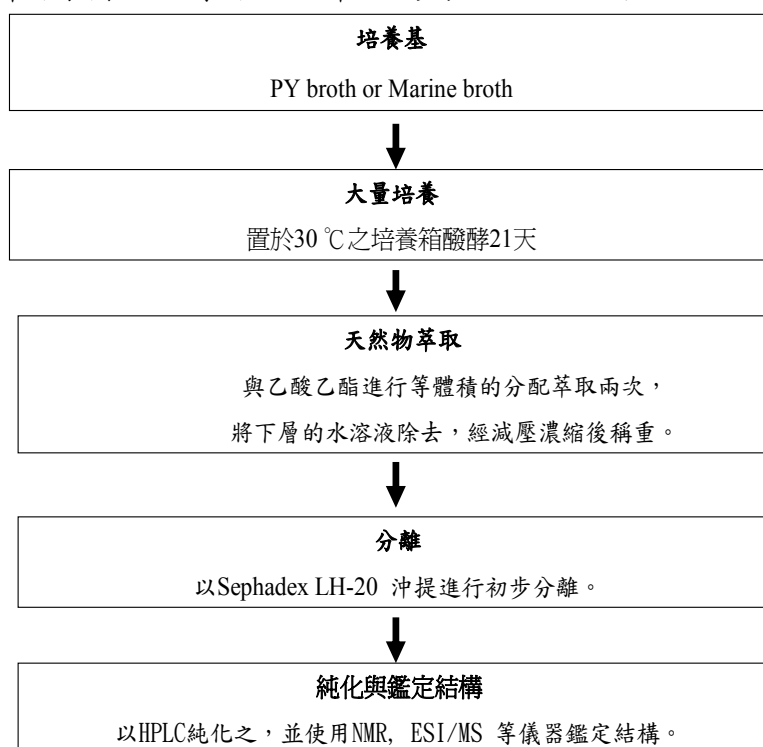
於無菌操作台中將上述各濃度之化合物取 150 μ L，加入在 96 well 內，並在每格中加入 50 μ L 的病原菌，使其總體積達至 200 μ L，每個 well 含有 2.4×10^6 CFU/ mL 之病原菌與不同濃度之化合物，置於 30 °C 培養箱進行培

養，並於 18 小時後，以 ELISA 分光光度計測量 OD 600 nm 的吸光值，藉以觀察化合物之抑菌能力，得到其最小抑制濃度 (MIC, minimum inhibitory concentration)。

3.4 海洋菌株之萃取與分離

將分離得到的菌株，大量培養於 PY Broth 30°C 下約 21 天，與乙酸乙酯進行等體積的分配萃取兩次，將下層的水溶液除去，經減壓濃縮後稱重。

海洋菌株醱酵液之萃取與天然物分離鑑定流程



3.4.1 #M1B 之成份分離與純化

取 #M1B (*P. aeruginosa*) 乙酸乙酯萃出物 0.7 g，以膠濾管柱 (Sephadex LH-20, 3 cm i.d. × 65 cm) 進行分離，流動相為甲醇，流速 2.0 mL/min，每 20 mL 收集為一管，共收取 40 管。以薄層層析 (展開溶媒 A) 檢測，依其組成的相似性合併為 7 個分液 (Fr. I ~ VII，如表 23 所示)。由 Fr. II、III 和 V 經不同條件分離後得到化合物 **1~6**，其分離純化之步驟分述如下。

表 23、#M1B 乙酸乙酯萃出物以膠濾管柱層析分離結果

Fr.	Tube (No.)	Contents
I	1~10	
II	11~13	1
III	14~15	2, 3
IV	16~17	4
V	18~20	5, 6
VI	21~40	

2-*n*-heptylquinol-4-one (**1**)

取 Fr. II 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (1:1)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 17.5 min，得到化合物 **1** (5.4 mg)。

2-aminophenyl acetate (**2**)

取 Fr. III 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (4:1)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 11.0 min，得到化合物 **2** (3.7 mg)。

cyclo-_L-Pro-_L-Phe (**3**)

取 Fr. III 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (4:1)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 15.3 min，得到化合物 **3** (3.1 mg)。

cyclo-L-Tyr-L-Pro (**4**)

取 Fr. III 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (9:1)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 9.2 min，得到化合物 **4** (5.9 mg)。

hydroxyphenazine (**5**)

取 Fr. IV 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (3:2)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 12.1 min，得到化合物 **5** (4 mg)。

phenazine-1-carboxamide (**6**)

取 Fr. III 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (3:2)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 9.4 min，得到化合物 **6** (5.9 mg)。

2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide (**11**)

取 Fr. III 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (2:3) 加醋酸銨 (CH₃COONH₄, 0.0001%)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 8.6 min，得到化

合物 **11** (6.3 mg)。

3.4.2 #MO6 之成份分離與純化

取 #MO6 (*B. firmus*) 乙酸乙酯萃出物 1.6 g，以膠濾管柱 (Sephadex LH-20, 3 cm i.d. × 65 cm) 進行分離，流動相為甲醇，流速 2.0 mL/min，每 20 mL 收集為一管，共收取 40 管。以薄層層析 (展開溶媒 A) 檢測，依其組成的相似性合併為 6 個分液 (Fr. I~VI，如表 24 所示)。由 Fr. II 和 III 經不同條件分離後得到化合物 **7~10**，其分離純化之步驟分述如下。

表 24、#MO6 乙酸乙酯萃出物以膠濾管柱層析分離結果

Fr.	Tube (No.)	Contents
I	1~9	
II	10~11	7, 8
III	12	9, 10
IV	13~14	
V	15~18	
VI	19~40	

N-(2'-Phenylethyl)isobutyramide (**7**)

取 Fr. II 以正相 HPLC 進行純化，使用 SiO₂ 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 EA，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 9.5 min，得到化合物 **7** (9.1 mg)。

2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide (**8**)

取 Fr. II 以正相 HPLC 進行純化，使用 SiO₂ 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 EA，流速為 2.0 mL/min，滯留

時間為 10.3 min，得到化合物 **8** (5.2 mg)。

2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide (**9**)

取 Fr. III 以正相 HPLC 進行純化，使用 SiO₂ 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 EA，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 8.7 min，得到化合物 **9** (7.0 mg)。

N-(2'-phenylethyl)isovaleramide (**10**)

取 Fr. III 以正相 HPLC 進行純化，使用 SiO₂ 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 EA，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 9.8 min，得到化合物 **10** (8.4 mg)。

3.4.3 #AW52 之成份分離與純化

取 #AW52 (Rhodobacteraceae) 乙酸乙酯萃出物 1.4 g，以膠濾管柱 (Sephadex LH-20, 3 cm i.d. × 65 cm) 進行分離，流動相為甲醇，流速 2.0 mL/min，每 20 mL 收集為一管，共收取 40 管。以薄層析 (展開溶媒 A) 檢測，依其組成的相似性合併為 8 個分液 (Fr. I ~ VIII，如表 25 所示)。由 Fr. III 和 IV 分離得到化合物 **12** ~ **15**，其分離純化之步驟分述如下。

表 25、#AW52 乙酸乙酯萃出物以膠濾管柱層析分離結果

Fr.	Tube (No.)	Contents
I	1~7	
II	8	
III	9~11	15
IV	12~13	4, 5, 12, 13, 14
V	14	
VI	15~16	
VII	17~19	
VIII	20~40	

cyclo-L-Pro-L-Leu (**12**)

取 Fr. IV 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (9:1)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 33 min，得到化合物 **12** (5.0 mg)。

cyclo-L-Pro-L-Val (**13**)

取 Fr. IV 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (9:1)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 15 min，得到化合物 **13** (4.4 mg)。

cyclo-L-Pro-L-Ile (**14**)

取 Fr. IV 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250 mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (7:3)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 7.5 min，得到化合物 **14** (3.8 mg)。

cyclo-L-Pro-L-Met sulfoxide (**15**)

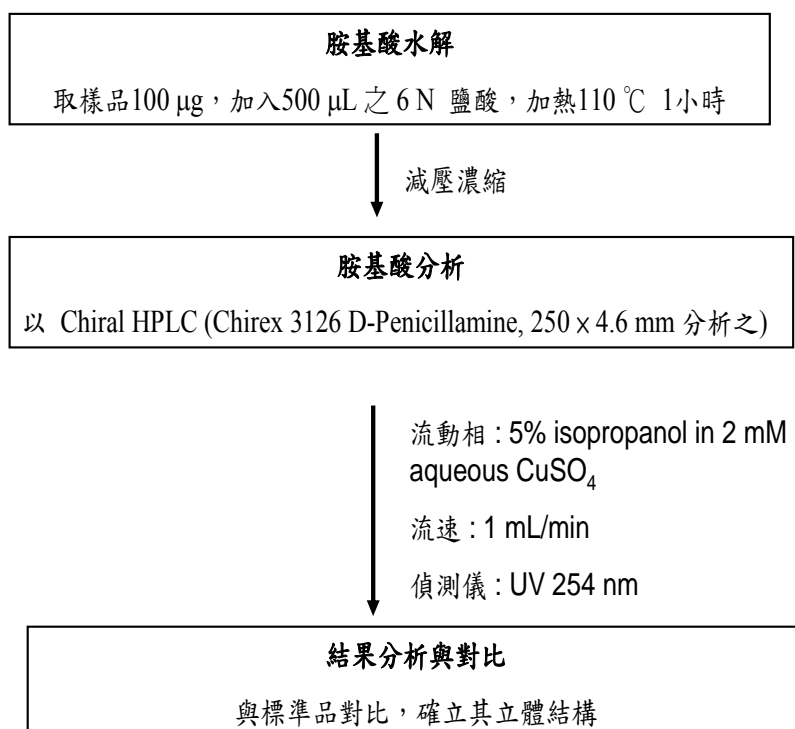
取 Fr. III 以逆相 HPLC 進行純化，使用 BDS 半製備級管柱 (10 × 250

mm)，配合 RI 偵測儀進行偵測，流動相為 H₂O/MeCN (19:1)，流速為 2.0 mL/min，滯留時間為 13 min，得到化合物 **15** (14.5 mg)。



3.5 胺基酸水解分析

取樣品 100 μg ，加入 500 μL 之 6N 鹽酸，加以攪拌加熱到 110 $^{\circ}\text{C}$ ，1 小時，待冷卻到室溫（約 15 分鐘），將其加入去離子水減壓濃縮至乾，重覆此動作數次，再以廣用試紙檢測其 pH 值，pH 值必須落在 2.5 以上以避免對產生管柱的損壞，之後再用 2 mL 之去離子水洗出，並取 1~2 μL 注入可分析胺基酸鏡相異構物的 HPLC 管柱進行分析，事先將標準品已去離子水配置完成並分析之。使用的流動相為含有 5% isopropanol in 2 aqueous mM CuSO_4 ，偵測儀為 UV 254 nm，流速為 1 mL/min，最後與標準品之滯留時間加以比對，藉此決定其立體位向。



Ps. L-Methionine sulfoxide 使用之流動相為1% Isopropanol in 2 mM aqueous CuSO_4

3.6 各成分之物理數據

2-*n*-heptylquinol-4-one (1) 之物理數據如下：

Brown powder

$[\alpha]_D^{24} +12.1^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₆H₂₁NO

IR ν_{\max} cm⁻¹

3315, 1642, 1512

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

234 (3.9), 315 (3.5), 327(3.5)

ESI/MS *m/z*

243 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 3

2-aminophenyl acetate (2) 之物理數據如下：

Yellow oil

$[\alpha]_D^{24} +2.4^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₈H₉NO₂

IR ν_{\max} cm⁻¹

3403, 1527, 1664

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

238 (2.5), 241 (2.5), 282 (1.9)

ESI/MS *m/z*

150 [M - H]⁻

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 4

cyclo-_L-Pro-_L-Phe (3) 之物理數據如下：

White powder

$[\alpha]_D^{24} -52.6^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₄H₁₆N₂O₂

IR v_{\max} cm⁻¹

3661, 1655, 1536

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

244 (2.4), 257 (2.4), 290 (2.2)

ESI/MS *m/z*

245 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 5

cyclo-_L-Pro-_L-Tyr (4) 之物理數據如下：

White powder

$[\alpha]_D^{24} -58.4^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₄H₁₆N₂O₃

IR v_{\max} cm⁻¹

1504, 3270, 1650

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

223 (3.3), 247 (2.1), 274 (2.6)

ESI/MS *m/z*

261 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 6

Hydroxyphenazine (5) 之物理數據如下：

Brown powder

$[\alpha]_D^{24} +14.8^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₂H₈N₂O

IR_{v_{max}} cm⁻¹

3370, 1517

UV (MeOH) : λ_{max} (log ε) nm

236 (2.9), 262 (3.3), 366 (2.5)

ESI/MS *m/z*

196 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 7

Phenazine-1-carboxamide (6) 之物理數據如下：

Pale yellow powder

$[\alpha]_D^{24} +19.4^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₃H₉N₃O

IR_{v_{max}} cm⁻¹

3697 , 1660

UV (MeOH) : λ_{max} (log ε) nm

248 (3.8), 366 (3.1), 387 (2.7)

ESI/MS *m/z*

224 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 8

N-(2'-Phenylethyl)isobutyramide (7) 之物理數據如下：

colorless powder

$[\alpha]_D^{24} +18.4^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₂H₁₇NO

IR ν_{\max} cm⁻¹

3291, 1640

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

252 (2.3), 258 (2.3), 260 (2.3)

ESI/MS *m/z*

192 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 9

2-Ethyl-*N*-(2'-phenethyl)butyramide (8) 之物理數據如下：

colorless powder

$[\alpha]_D^{24} +4.18^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₂H₁₇NO

IR ν_{\max} cm⁻¹

3294, 1643, 1546

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

267 (2.5)

ESI/MS *m/z*

193 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 10

2-Methyl-*N*-(2'-phenylethyl)butyramide (**9**) 之物理數據如下：

yellow powder

$[\alpha]_D^{24} + 31.5^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₃H₁₉NO

IR ν_{\max} cm⁻¹

3288, 1641

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

257 (2.8)

ESI/MS *m/z*

206 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 11

N-(2'-phenylethyl)isovaleramide (**10**) 之物理數據如下：

borwn powder

$[\alpha]_D^{24} + 27.76^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₃H₁₉NO

IR ν_{\max} cm⁻¹

3303, 1622

UV (MeOH) : λ_{\max} (log ϵ) nm

260 (2.1)

ESI/MS *m/z*

206 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 12

2-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide (**11**) 之物理數據如下：

borwn powder

$[\alpha]_D^{24} +12.3^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₆H₂₁NO₂

IRv_{max} cm⁻¹

3301, 1599, 1504

UV (MeOH) : λ_{max} (log ε) nm

240 (3.4), 328 (3.0)

ESI/MS *m/z*

260.5 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 13

cyclo-L-Pro-L- Leu (**12**) 之物理數據如下：

white powder

$[\alpha]_D^{24} -42.8^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₁H₁₈N₂O₂

IRv_{max} cm⁻¹

3266, 1634,

ESI/MS *m/z*

211.3 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 14

cyclo-L-Pro-L-Val (**13**) 之物理數據如下：

white powder

$[\alpha]_D^{24}$ -141.0° (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₀H₁₆N₂O₂

IR_{vmax} cm⁻¹

3698, 1660, 1374

ESI/MS *m/z*

197.3 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 15

cyclo-L-Pro-L-Ile (**14**) 之物理數據如下：

white powder

$[\alpha]_D^{24}$ -24.5° (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₁H₁₈N₂O₂

IR_{vmax} cm⁻¹

3682, 1702, 1332

ESI/MS *m/z*

211.3 [M + H]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 16

cyclo-L-Pro-L-Met sulfoxide (**15**) 之物理數據如下：

white powder

$[\alpha]_D^{24} -52.6^\circ$ (*c* 0.50, MeOH)

Formula : C₁₀H₁₆N₂O₃S

IR_v_{max} cm⁻¹

3414, 1652, 1014

ESI/MS *m/z*

267 [M + Na]⁺

¹H-NMR 及 ¹³C-NMR 如表 17



参考文献

1. Ruggieri, G. D., Drugs from the sea. *Science* **1976**, 194, (4264), 491-7.
2. Chen, R. H.; Buko, A. M.; Whittern, D. N.; McAlpine, J. B., Pacidamycins, a novel series of antibiotics with anti-*Pseudomonas aeruginosa* activity. II. Isolation and structural elucidation. *J Antibiot (Tokyo)* **1989**, 42, (4), 512-20.
3. Mayer, A. M.; Gustafson, K. R., Marine pharmacology in 2003-2004: anti-tumour and cytotoxic compounds. *Eur J Cancer* **2006**, 42, (14), 2241-70.
4. Proksch, P.; Edrada, R. A.; Ebel, R., Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* **2002**, 59, (2-3), 125-34.
5. Kim, H. S.; Shibata, Y.; Ko, N.; Ikemoto, N.; Ishizuka, Y.; Murakami, N.; Sugimoto, M.; Kobayashi, M.; Wataya, Y., Potent in vivo antimalarial activity of 3, 15-di-O-acetylbruceolide against *Plasmodium berghei* infection in mice. *Parasitol Int* **2000**, 48, (3), 271-4.
6. Matsui, T.; Ohtsuka, Y.; Sakai, K., [Recent advances in tetrodotoxin research]. *Yakugaku Zasshi* **2000**, 120, (10), 825-37.
7. Moore, R. E.; Scheuer, P. J., Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. *Science* **1971**, 172, (982), 495-8.
8. Burkholder, P. R.; Pfister, R. M.; Leitz, F. H., Production of a pyrrole antibiotic by a marine bacterium. *Appl Microbiol* **1966**, 14, (4), 649-53.
9. Shibata, S.; Ishida, Y.; Kitano, H.; Ohizumi, Y.; Habon, J.; Tsukitani, Y.; Kikuchi, H., Contractile effects of okadaic acid, a novel ionophore-like substance from black sponge, on isolated smooth muscles under the condition of Ca deficiency. *J Pharmacol Exp Ther* **1982**, 223, (1), 135-43.
10. Omura, S.; Iwai, Y.; Hirano, A.; Nakagawa, A.; Awaya, J.; Tsuchya, H.; Takahashi, Y.; Masuma, R., A new alkaloid AM-2282 of *Streptomyces* origin. Taxonomy,

- fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1977**, 30, (4), 275-82.
11. Agata, N.; Mori, M.; Ohta, M.; Suwan, S.; Ohtani, I.; Isobe, M., A novel dodecadeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* **1994**, 121, (1), 31-4.
 12. Umezawa, H.; Okami, Y.; Kurasawa, S.; Ohnuki, T.; Ishizuka, M.; Takeuchi, T.; Shio, T.; Yugari, Y., Marinactan, antitumor polysaccharide produced by marine bacteria. *J Antibiot (Tokyo)* **1983**, 36, (5), 471-7.
 13. Selvin, J.; Shanmugha Priya, S.; Seghal Kiran, G.; Thangavelu, T.; Sapna Bai, N., Sponge-associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution. *Microbiol Res* **2007**.
 14. Erickson, K. L.; Beutler, J. A.; Cardellina, I. J.; Boyd, M. R., Salicylhalamides A and B, Novel Cytotoxic Macrolides from the Marine Sponge *Haliclona* sp. *J Org Chem* **1997**, 62, (23), 8188-8192.
 15. Jaruchoktaweechai, C.; Suwanborirux, K.; Tanasupawatt, S.; Kittakoop, P.; Menasveta, P., New macrolactins from a marine *Bacillus* sp. Sc026. *J Nat Prod* **2000**, 63, (7), 984-6.
 16. Lindel, T. J., Paul R.; Fenical, William, Lagunapyrones A-C: cytotoxic acetogenins of a new skeletal class from a marine sediment bacterium. *Tetrahedron Letters* **1996**, 37, (9), 1327-30.
 17. Kameyama, T.; Takahashi, A.; Kurasawa, S.; Ishizuka, M.; Okami, Y.; Takeuchi, T.; Umezawa, H., Bisucaberin, a new siderophore, sensitizing tumor cells to macrophage-mediated cytolysis I. Taxonomy of the producing organism, isolation and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)* **1987**, 40, (12), 1664-70.
 18. Torres, Y. R.; Berlinck, R. G.; Nascimento, G. G.; Fortier, S. C.; Pessoa, C.; de Moraes, M. O., Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of

- four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon* **2002**, 40, (7), 885-91.
19. Kitahara, T.; Naganawa, H.; Okazaki, T.; Okami, Y.; Umezawa, H., The structure of SS-228Y, an antibiotic from *Chainia* Sp. *J Antibiot (Tokyo)* **1975**, 28, (4), 208-5.
 20. Perez Baz, J.; Canedo, L. M.; Fernandez Puentes, J. L.; Silva Elipe, M. V., Thiocoraline, a novel depsipeptide with antitumor activity produced by a marine *Micromonospora* II. Physico-chemical properties and structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* **1997**, 50, (9), 738-41.
 21. Imamura, N.; Nishijima, M.; Takadera, T.; Adachi, K.; Sakai, M.; Sano, H., New anticancer antibiotics pelagiomicins, produced by a new marine bacterium *Pelagibacter variabilis*. *J Antibiot (Tokyo)* **1997**, 50, (1), 8-12.
 22. Takahashi, A.; Ikeda, D.; Nakamura, H.; Naganawa, H.; Kurasawa, S.; Okami, Y.; Takeuchi, T.; Iitaka Y, Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. II. Structure determination. *J Antibiot (Tokyo)* **1989**, 42, (11), 1562-6.
 23. Hale, K. J.; Dimopoulos, P.; Cheung, M. L.; Frigerio, M.; Steed, J. W.; Levett, P. C., A biosynthetic proposal for ring formation in the antitumor agent halichomycin. Asymmetric synthesis of the AB-carbon backbone of halichomycin. *Org Lett* **2002**, 4, (6), 897-900.
 24. Bae, M. A.; Kang, H. S.; Rue, S. W.; Seu, J. H.; Kim, Y. H., Enhanced expression of Fas ligand is associated with aburatubolactam C-induced apoptosis in human Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1998**, 246, (1), 276-81.
 25. Schumacher, R. W.; Davidson, B. S.; Montenegro, D. A.; Bernan, V. S., Gamma-indomycinone, a new pluramycin metabolite from a deep-sea derived actinomycete. *J Nat Prod* **1995**, 58, (4), 613-7.
 26. Brotz-Oesterhelt, H.; Beyer, D.; Kroll, H. P.; Endermann, R.; Ladel, C.; Schroeder, W.; Hinzen, B.; Raddatz, S.; Paulsen, H.; Henninger, K.; Bandow, J. E.; Sahl, H. G.;

- Labischinski, H. Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat Med* **2005**, 11, (10), 1082-7.
27. Marinone, C.; Martinetti, A.; Mestriner, M.; Seregni, E.; Geuna, M.; Ferrari, L.; Strola, G.; Bonardi, L.; Fea, E.; Bombardieri, E., p53 evaluation in gastric mucosa of patients with chronic *Helicobacter pylori* infection. *Anticancer Res* **2001**, 21, (2A), 1115-8.
28. Iwagawa, T.; Kaneko, M.; Okamura, H.; Nakatani, M.; van Soest, R. W. M., New alkaloids from the papua new guinean sponge *agelas nakamurai*. *J Nat Prod* **1998**, 61, (10), 1310-2.
29. Shiozawa, H.; Kagasaki, T.; Kinoshita, T.; Haruyama, H.; Domon, H.; Utsui, Y.; Kodama, K.; Takahashi, S., Thiomarinol, a new hybrid antimicrobial antibiotic produced by a marine bacterium. Fermentation, isolation, structure, and antimicrobial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **1993**, 46, (12), 1834-42.
30. Gerard, J. M.; Haden, P.; Kelly, M. T.; Andersen, R. J., Loloatins A-D, cyclic decapeptide antibiotics produced in culture by a tropical marine bacterium. *J Nat Prod* **1999**, 62, (1), 80-5.
31. Laatsch, H. P., Heinz, Marine bacteria. I. Synthesis of pentabromopseudilin, a cytotoxic phenylpyrrole from *Alteromonas luteoviolaceus*. *Liebigs Annalen der Chemie* **1989**, 9, 863-881.
32. Yoshikawa, K.; Takadera, T.; Adachi, K.; Nishijima, M.; Sano, H., Korormicin, a novel antibiotic specifically active against marine gram-negative bacteria, produced by a marine bacterium. *J Antibiot (Tokyo)* **1997**, 50, (11), 949-53.
33. Jayatilake, G. S.; Thornton, M. P.; Leonard, A. C.; Grimwade, J. E.; Baker, B. J., Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J Nat Prod* **1996**, 59, (3), 293-6.
34. Sato, K.; Okazaki, T.; Maeda, K.; Okami, Y., New antibiotics, aplasmomycins B and

- C. J Antibiot (Tokyo)* **1978**, 31, (6), 632-5.
35. Oclarit, J. M.; Okada, H.; Ohta, S.; Kaminura, K.; Yamaoka, Y.; Iizuka, T.; Miyashiro, S.; Ikegami, S., Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios* **1994**, 78, (314), 7-16.
36. Gerard, J.; Lloyd, R.; Barsby, T.; Haden, P.; Kelly, M. T.; Andersen, R. J., Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two *pseudomonads* isolated from marine habitats. *J Nat Prod* **1997**, 60, (3), 223-9.
37. Mikhailov, V. V.; Kuznetsova, T. A.; Eliakov, G. B. [Bioactive compounds from marine actinomycetes] *Bioorg Khim* **1995**, 21, (1), 3-8.
38. Imamura, N.; Nishijima, M.; Adachi, K.; Sano, H., Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J Antibiot (Tokyo)* **1993**, 46, (2), 241-6.
39. Okami, Y.; Hotta, K.; Yoshida, M.; Ikeda, D.; Kondo, S.; Umezawa, H., New aminoglycoside antibiotics, istamycins A and B. *J Antibiot (Tokyo)* **1979**, 32, (9), 964-6.
40. Graziani, E. I.; Ritacco, F. V.; Bernan, V. S.; Telliez, J. B., Phaeochromycins A-E, anti-inflammatory polyketides isolated from the soil actinomycete *Streptomyces phaeochromogenes* LL-P018. *J Nat Prod* **2005**, 68, (8), 1262-5.
41. Imamura, N.; Adachi, K.; Sano, H., Magnesidin A, a component of marine antibiotic magnesidin, produced by *Vibrio gazogenes* ATCC29988. *J Antibiot (Tokyo)* **1994**, 47, (2), 257-61.
42. Tan, L.; Ma, D., Total synthesis of salinamide A: a potent anti-inflammatory bicyclic depsipeptide. *Angew Chem Int Ed Engl* **2008**, 47, (19), 3614-7.
43. Brinkhoff, T. B., Gabriela; Heidorn, Thorsten; Liang, Lanfang; Schlingloff, Andrea; Simon, Meinhard., Antibiotic production by a *Roseobacter* clade-affiliated species

- from the German Wadden Sea and its antagonistic effects on indigenous isolates. *Appl and Envir Micro* **2004**, 70, (4), 2560-2565.
44. Debitus, C. G., *Graziano*; Mancini, *Ines*; Waikedre, *Jean*; Guemas, *Jean-Pierre*; Nicolas, *Jean Louis*; Pietra, *Francesco* ., Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea creba* from the Coral Sea. *Journal of Marine Biotechnology* **1998**, 6, (3), 136-141.
 45. Yang, W. D., *Larry*; Rosazza, John P. N., Aeruginol [2 -(2 '- hydroxyphenyl)- 4 - hydroxymethylthiazole], a new secondary metabolite from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products* **1993**, 56, (11), 1993-4.
 46. Rubtn O. Ferndndez, R. A. P., High-performance liquid chromatographic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines. *Journal of Chromatography A* **1997**, 99-104.
 47. R, L. T. M., Secondary metabolites of the fluorescent *pseudomonads*. Microbiological reviews. *Microbiological reviews* **1979**, 43, (3), 422-42.
 48. Youard, Z. A. M., Gaetan L. A; Majcherczyk, *Paul A*; Schalk, *Isabelle J*; Reimmann, *Cornelia*., *Pseudomonas fluorescens* CHA0 produces enantio-pyochelin, the optical antipode of the *Pseudomonas aeruginosa* siderophore pyochelin. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282, (49), 35546-35553.
 49. Upson, H. T., The molecular rearrangement of Amino phenyl alkyl carbonic acid ester, III. [machine translation]. *American Chemical Journal* **1904**, 32, 13-43.
 50. Itoh, N.; Morinaga, N.; Nomura, A., A variety of catalases and bromoperoxidases in genus *Pseudomonas* and their characterization. *Biochim Biophys Acta* **1992**, 1122, (2), 189-95.
 51. Gamard, P.; Sauriol, F.; Benhamou, N.; Belanger, R. R.; Paulitz, T. C., Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *J Antibiot (Tokyo)* **1997**, 50, (9), 742-9.
 52. Reimmann, C.; Patel, H. M.; Serino, L.; Barone, M.; Walsh, C. T.; Haas, D.,

- Essential PchG-dependent reduction in pyochelin biosynthesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **2001**, 183, (3), 813-20.
53. Takeda, R. N., Itaru, *Pseudomonas* pigments. VIII. Production of pyoluteorin by fermentation with *Pseudomonas aeruginosa* T 359. *Hakko Kogaku Zasshi* **1959**, 38, 9-19.
54. Jayatilake, G. S. T., M. P.; Leonard, A. C.; Grimwade, J. E.; Baker, B. J. , Metabolites from an Antractic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nat. Prod.*
55. Maskey, R. P.; Asolkar, R. N.; Kapaun, E.; Wagner-Dobler, I.; Laatsch, H., Phytotoxic arylethylamides from limnic bacteria using a screening with microalgae. *J Antibiot (Tokyo)* **2002**, 55, (7), 643-9.
56. Soong, C. L.; Ogawa, J.; Shimizu, S., A novel amidase (half-amidase) for half-amide hydrolysis involved in the bacterial metabolism of cyclic imides. *Appl Environ Microbiol* **2000**, 66, (5), 1947-52.
57. Kitamura, S.; Hashizume, K.; Iida, T.; Miyashita, E.; Shirahata, K.; Kase, H., Studies on lipoxygenase inhibitors. II. KF8940 (2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide), a potent and selective inhibitor of 5-lipoxygenase, produced by *Pseudomonas methanica*. *J Antibiot (Tokyo)* **1986**, 39, (8), 1160-6.